

**Characterising and identifying disseminated metastatic cancer cells**

4B6

**Publication number:** DE19736691**Publication date:** 1999-02-25**Inventor:** GIESING MICHAEL PROF DR MED (DE)**Applicant:** GIESING MICHAEL PROF DR MED (DE)**Classification:****- international:** **C12Q1/68; C12Q1/68;** (IPC1-7): C12Q1/68; G01N33/68**- European:** C12Q1/68M6B**Application number:** DE19971036691 19970822**Priority number(s):** DE19971036691 19970822**Also published as:**

WO9910528 (A1)



EP1007740 (A1)



US7056660 (B1)



EP1007740 (A0)



CA2301962 (A1)

**Report a data error here****Abstract of DE19736691**

Characterising and identifying disseminated and metastatic cancer cells using RNA and DNA comprises examining a body fluid sample for at least one cancer-specific gene (I) and at least one cancer-associated gene (II). An Independent claim is also included for agents used in the new process, preferably in test and/or diagnostic kits.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑧ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 197 36 691 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 12 Q 1/68**  
G 01 N 33/68

⑦① Aktenzeichen: 197 36 691.0  
⑦② Anmeldetag: 22. 8. 97  
⑦③ Offenlegungstag: 25. 2. 99

DE 197 36 691 A 1

⑦① Anmelder:  
Giesing, Michael, Prof. Dr.med., 45659  
Recklinghausen, DE

⑦④ Vertreter:  
Kinzebach und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:  
Antrag auf Teilnichtnennung  
Giesing, Michael, Prof. Dr.med., 45659  
Recklinghausen, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
zu ziehende Druckschriften:

DE	195 00 723 A1
DE	37 21 400 A1
DE	37 17 212 A1
US	56 46 042
US	56 33 142
US	56 20 848
US	56 01 990
US	55 89 579
US	55 63 247
US	53 20 947
US	51 49 628
WO	97 28 186 A1
WO	97 26 271 A1
WO	96 34 627 A1
WO	96 27 663 A2
WO	96 21 021 A2
WO	96 15 262 A2
WO	96 01 907 A1
WO	95 16 792 A1
WO	93 22 456 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verfahren zur Charakterisierung und Identifizierung disseminierter und metastasierter Krebszellen
- ⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung und Identifizierung disseminierter und metastasierter Krebszellen mit Hilfe von RNA und DNA, wobei man eine Körperflüssigkeit auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen und wenigstens ein krebsassoziiertes Gen untersucht. Zu den krebspezifischen Genen zählen Onkogene, mutierte Tumorsuppressor-Gene und Gene, die bei Nicht-Krebszellen in der untersuchten Körperflüssigkeit im wesentlichen nicht exprimiert werden. Die krebsassoziierten Gene sind beispielsweise gewebe-spezifisch, korrelieren mit der Metastasierungsfähigkeit zirkulierender Krebszellen, kodieren für Steroidhormon-rezeptoren, umfassen Chemoresistenz-Gene oder korrelieren mit der Immunmodulation, Zellproliferation oder Apoptose. Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

DE 197 36 691 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung und Identifizierung disseminierter und metastasierter Krebszellen mit Hilfe von RNA und DNA sowie Mittel zur Durchführung des Verfahrens.

- 5 Die Diagnose von Krebs stellt nach wie vor eine der größten Herausforderungen dar, die heutzutage an die Medizin gestellt werden. Gängige Diagnoseverfahren erlauben die Erkennung von krebsartigen Geschwülsten, die im folgenden umfassend als Tumore (Sarkome, Karzinome, systemisch-hämatologische Malignome) bezeichnet werden sollen, häufig erst dann, wenn der Tumor schon ein fortgeschrittenes Stadium erreicht hat. Trotz erheblicher Fortschritte bei bildgebenden Verfahren setzt deren erfolgreiche Anwendung immer eine gewisse Mindestgröße des Tumors voraus. Zudem läßt
- 10 sich mit derartigen Verfahren – wenn überhaupt – nur sehr wenig weiterführende Information über die Art und Beschaffenheit des Tumors gewinnen. Die zeitaufwendigen und kostenintensiven bildgebenden Verfahren dienen daher in der Regel lediglich als Orientierungshilfen für das weitere, häufig direkte Vorgehen, in der Regel eine Gewebeentnahme. Letztere Maßnahme bedeutet aber einen invasiven Eingriff in den Körper des Patienten, der je nach Lage und Beschaffenheit des Tumors für den Patienten sehr unangenehm oder sogar gefährlich sein kann.

- 15 Wird anhand einer solchen Gewebeentnahme ein Tumor diagnostiziert, folgen normalerweise weitere Untersuchungen, die beispielsweise das Streuungspotential, d. h. die Metastasenbildung, dieses Tumors beschreiben sollen. Wird z. B. Brustkrebs diagnostiziert, entnimmt man der betroffenen Patientin in der Regel 20 bis 30 Lymphknoten und bestimmt die Anzahl der Lymphknoten, die Krebszellen aufweisen. Die herrschende Meinung geht davon aus, daß die Überlebenschance einer Patientin mit zunehmender Anzahl befallener Lymphknoten abnimmt. Neuere Erkenntnisse
- 20 deuten allerdings an, daß das Auftreten solcher Lymphknoten-Metastasen eher ein Maß für das Alter des Tumors als für seine Aggressivität oder sein Metastasierungspotential sind.

- Im Zuge der fortschreitenden Entwicklung molekularbiologischer Methoden und dem zunehmenden Wissen über die genetischen Hintergründe der Zellentartung hat man in den letzten Jahren neue Wege beschritten, Krebs zu diagnostizieren. Man ging davon aus, daß Krebszellen charakteristische Marker exprimieren, aufgrund derer sie von nichtentarteten
- 25 Zellen zu unterscheiden und somit als Krebszellen zu identifizieren sein sollten. Mit der Entwicklung der Hybridomtechnik und der dadurch ermöglichten Züchtung monoklonaler Antikörper wurden eine Vielzahl von Immunoassays entworfen, die durch den Nachweis bestimmter Marker zur Diagnose von Krebs beitragen sollen. Beispiele für solche Marker sind das karzinoembryonale Antigen (CEA), das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) oder das prostataspezifische Antigen (PSA). In der EP 0 747 705 wurde kürzlich vorgeschlagen, nur die 90 kDa-Glycoform einer zu CEA strukturell verwandten Gruppe von Proteinen (NCAs) im Blut zu untersuchen, da scheinbar nur diese Glycoform in den Blutstrom abgegeben wird. Die
- 30 WO 96/21862 gibt an, daß die Messung der Konzentration an A-Protein im Blut die Diagnose von Krebs gestatten würde, stellt aber auch fest, daß die Hoffnungen, die in bis dahin untersuchte Marker, wie CEA, AFP oder PSA gesetzt wurden, nicht erfüllt worden sind. Eine verlässliche Diagnose von Krebs scheint auf diese Art zumindest zur Zeit nicht möglich zu sein.

- 35 Andere Forscherteams haben sich dagegen auf die Analyse des genetischen Materials von Krebszellen konzentriert. So schlägt die WO 93/04200 vor, zur Abschätzung einer Veranlagung für Brustkrebs DNA aus einer Blutprobe der Patientin zu isolieren, diese DNA auf bestimmte Weise zu restringieren und aufgrund des Restriktionsmusters eine entsprechende Diagnose zu stellen. Ein Nachweis von Tumorzellen im Blut ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich.

- Die WO 96/02671 beschreibt darüber hinaus ein Verfahren, nach dem man genomische DNA oder cDNA aus neoplastischem Gewebe, Blut oder einer anderen Körperflüssigkeit durch Sequenzanalyse auf Mutationen eines Gens untersucht, welches für ein Protein kodiert, dessen Funktionsstörung mit Krebs in Zusammenhang gebracht wird.

- In ähnlicher Weise schlägt die WO 95/16792 vor, die im Blutplasma vorhandene DNA auf onkogene Mutationen oder Deletionen, Tumorsuppressor-Gen-Mutationen oder -Deletionen oder Veränderungen des Mikrosatellitenmusters zu untersuchen.

- 45 Schließlich beschreibt auch die WO 94/10343 ein Verfahren zur Diagnose von Krebs, nämlich zur Erkennung von Prostatakrebs-Mikrometastasen, wobei man das Blut eines Patienten auf RNA untersucht, die für das prostataspezifische Antigen kodiert. In diesem Fall wird also keine krebsauslösende oder zu Krebs ursächlich beitragende Mutation nachgewiesen, sondern es wird davon ausgegangen, daß ins Blut abgegebenes PSA Prostatakrebs anzeigt. Allerdings werden bei diesem Verfahren in etwa zwei Dritteln der Fälle sogenannte falsch-positive Antworten erhalten, da auch Entzündungen oder Verletzungen der Prostata die Konzentration des Proteins im Blut erhöhen. Andererseits bleiben aufgrund
- 50 von Unzulänglichkeiten des Tests vermutlich 30% der Krebserkrankungen nach wie vor unentdeckt.

Zusammenfassend läßt sich daher feststellen, daß der Stand der Technik keine zuverlässige Diagnose von Krebs zuläßt oder sehr spezifische Verfahren beschreibt, mit denen sich einige ganz bestimmte Krebsarten untersuchen lassen, die jedoch auf andere Krebsformen nicht übertragbar sind.

- 55 Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein in-vitro Verfahren zu schaffen, mit dem verschiedene Krebsformen zuverlässig und hinreichend genau auch für einzelne Patienten beurteilt werden können, und entsprechende Mittel bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird überraschenderweise durch Mittel und ein Verfahren zur Charakterisierung und Identifizierung von zirkulierenden Krebszellen mit Hilfe RNA und DNA gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Körperflüssigkeit auf wenigstens ein krebspezifisches Gen und wenigstens ein krebsassoziiertes Gen untersucht.

- 60 Unter Charakterisierung werden erfindungsgemäß alle jene Maßnahmen verstanden, die an Zellen durchgeführt werden können, um einen oder mehrere Parameter dieser Zellen qualitativ oder quantitativ zu erfassen. Aufgrund der durch die Charakterisierung gewonnenen Ergebnisse kann dann die Identifizierung der Zellen vorgenommen werden. Dies umfaßt erfindungsgemäß nicht nur den qualitativen Nachweis von zirkulierenden Krebszellen, sondern kann auch deren
- 65 Quantifizierung und/oder Angaben über deren Herkunft und Verhalten, beispielsweise bezüglich der Metastasenbildung oder bei verschickelten, beispielsweise cytotoxischen Therapien einhalten.

Zu zirkulierenden Krebszellen gehören erfindungsgemäß vor allem solche Krebszellen, die sich vom Primärtumor abgelöst haben, d. h. disseminierte Krebszellen. Auch metastasierte Krebszellen gehören dazu. Da die Streuung dieser Zel-

len in der Regel mit der Vaskularisierung des Primärtumors zusammenhängt, kann man zirkulierende Krebszellen insbesondere im Blut auffinden, wobei auch Knochenmark und Lymphknoten geeignet sind. Dementsprechend werden erfindungsgemäß Körperflüssigkeiten, wie Blut, Lymphe oder im weitesten Sinne auch Knochenmark, untersucht.

Erfindungsgemäß wird zwischen krebspezifischen und krebsassoziierten Genen unterschieden. Krebspezifisch im erfindungsgemäßen Sinn sind solche Gene, anhand derer sich eine zirkulierende Krebszelle als solche erkennen läßt. Mit anderen Worten versteht man unter einer Untersuchung auf ein krebspezifisches Gen erfindungsgemäß eine Untersuchung auf ein Gen zur krebspezifischen Charakterisierung und Identifizierung zirkulierender Krebszellen. Krebsassoziierte Gene dagegen sind nicht spezifisch für Krebszellen. Sie können auch in gesunden Zellen oder bei einer Vielzahl verschiedener anderer Erkrankungen, beispielsweise Entzündungen, exprimiert werden. Allerdings kann deren Expression in Krebszellen im Vergleich zu Nicht-Krebszellen charakteristisch moduliert sein, so daß weitere Rückschlüsse auf die Art und das Verhalten der Krebszellen möglich sind. Unter einer Untersuchung auf ein krebsassoziiertes Gen wird erfindungsgemäß also eine Untersuchung auf ein Gen zur krebsassoziierten Charakterisierung und Identifizierung zirkulierender Krebszellen verstanden.

In diesem Sinn ist es natürlich auch möglich, daß ein bestimmtes Gen sowohl krebspezifisch als auch krebsassoziiert ist, d. h. sowohl zur krebspezifischen als auch krebsassoziierten Charakterisierung und Identifizierung beitragen kann. Beispielsweise kann ein Gen eine Mutation aufweisen, die zur anomalen Expression eines Zellzyklus-regulierenden Proteins und infolgedessen zur Entartung der betroffenen Zelle führt. Dieses mutierte Gen ist daher krebspezifisch und die erfindungsgemäße Untersuchung auf den Nachweis dieses mutierten Gens dient zur krebspezifischen Charakterisierung. Darüber hinaus kann eine Analyse der anomalen Expression dieses Gens auch zur krebsassoziierten Charakterisierung beitragen, da die Art oder Menge entsprechender Expressionsprodukte für den Zellzyklus von Bedeutung sind und dadurch weitere Rückschlüsse auf die Art und das Verhalten der Krebszellen möglich sind. Ein weiteres Beispiel stellen die unten näher beschriebenen gewebsspezifischen Gene dar, die – sofern sie in Nicht-Krebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit nicht exprimiert werden – krebspezifisch sein und darüber hinaus aufgrund ihrer Gewebsspezifität zur krebsassoziierten Charakterisierung und Identifizierung, nämlich der Lokalisation des Primärtumors, von die zirkulierenden Krebszellen abstammen, beitragen können.

Die Untersuchung auf krebspezifische und krebsassoziierte Gene kann auf jede dem Fachmann erdenkliche Art und Weise vorgenommen werden. So kann ein erfindungsgemäßes Gen auf DNA-Ebene oder auf RNA-Ebene, d. h. anhand entsprechender Expressionsprodukte, charakterisiert werden. Bevorzugt sind Methoden, mit deren Hilfe die Beteiligung eines Gens am Zustand zirkulierender Zellen zum Untersuchungszeitpunkt bewertet werden kann, z. B. die Charakterisierung von mRNA insbesondere im Hinblick auf die transkribierte und/oder translatierte Menge an einer bestimmten mRNA. Im folgenden wird, sofern nichts anderes angegeben ist, umfassend von einer Untersuchung oder Analyse der erfindungsgemäßen Gene gesprochen.

Darüber hinaus kann das erfindungsgemäße Verfahren auch eine Untersuchung einer Körperflüssigkeit auf Proteine umfassen. Dabei handelt es sich insbesondere um diejenigen, die von den krebspezifischen und/oder krebsassoziierten Genen exprimiert werden.

Die in der nachfolgenden Beschreibung aufgeführten spezifischen Gene werden häufig mit Abkürzungen oder Codes bezeichnet, die üblicherweise verwendet werden und dem Fachmann deshalb bekannt sind. Darüber hinaus kann das am Ende der vorliegenden Beschreibung eingefügte Glossar zur Erläuterung herangezogen werden.

Zu den erfindungsgemäßen krebspezifischen Genen zählen insbesondere zwei Klassen von Genen, die bei der Krebsentstehung eine wesentliche Rolle spielen: Onkogene, die durch Mutation aus sogenannten Proto-Onkogenen entstehen und mutierte Tumorsuppressor-Gene. Beide dirigieren in ihrer normalen Form den Lebenszyklus einer Zelle: Proto-Onkogene fördern das Zellwachstum, Tumorsuppressor-Gene bremsen es. Onkogene sind krebsbegünstigend, da sie die Zelle zu übermäßiger Vermehrung anregen, während Tumorsuppressor-Gene zur Krebsentstehung beitragen, wenn sie durch Mutation inaktiviert werden und die Zelle infolgedessen eine Wachstumsbremse verliert, durch die sie normalerweise an einer unangemessenen Vermehrung gehindert wird. Onkogene kodieren beispielsweise für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Signalproteine, Transkriptionsfaktoren und eine Vielzahl anderer Proteine, von denen einige beispielsweise bei der Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Zu den Onkogenen zählen beispielsweise Gene, wie die *hcl-2*-Familie, *mdm2*, *c-abl*, die *myc*-Familie, beispielsweise *c-N*, *R*, *L* und *B-myc*, die *ras*-Familie, beispielsweise *H*, *K* und *N-ras*, *erb-B2*, das auch neu genannt wird, *erb-B*, *PDX1*, *RET* und virale Onkogene verschiedener Tumoviren, wie Papovaviren, beispielsweise SV40-, Polyoma- und Papillomaviren, wie HPV, Adenoviren, bestimmte Herpesviren, Pockenviren, Hepatitis-B-Viren (HBx-Gen), Hepatitis-C-Viren, HTLV1, E1A-Fusionstranskript bei Adenoviren, E6- und E7-Fusionstranskripte bei HPV und EBV beim Burkitt-Lymphom.

Erfindungsgemäß bevorzugte Onkogene sind Gene der *ras*-Familie, insbesondere *K-ras*, *erb-B2*, *erb-B*, *c-myc*, und *hcl-2*, Hepatitis-B-Viren (HBx-Gen), Hepatitis-C-Viren, HTLV1, E1A-Fusionstranskript bei Adenoviren, E6- und E7-Fusionstranskripte bei HPV und EBV beim Burkitt-Lymphom.

Zu den Tumorsuppressor-Genen zählen beispielsweise die Gene der APC-Familie (FAP), DPC4, NF-1, NF-2, MTS1, RB, p53, WT1, BRCA1, BRCA2, VHL, MSI2, MLH1 und WAF1.

Erfindungsgemäß bevorzugte Tumorsuppressor-Gene sind p53, RB, BRCA1, BRCA2, MSI2, MLH1 und WAF1.

Zu den krebspezifischen Genen zählen neben Onkogenen und mutierten Tumorsuppressor-Genen auch Gene, die bei Nicht-Krebszellen in erfindungsgemäß untersuchten Körperflüssigkeiten abgeschaltet sind, d. h. nicht oder nur in unwesentlichen Mengen exprimiert werden. Werden daher Translations- und/oder Transkriptionsprodukte dieser Gene in einer Körperflüssigkeit, beispielsweise Blut, nachgewiesen, spricht dies für das Vorliegen zirkulierender Krebszellen in der betreffenden Körperflüssigkeit.

Zu derartigen Genen zählen viele der unten aufgeführten gewebsspezifischen Gene, die aufgrund ihrer Gewebsspezifität zur erfindungsgemäßen krebsassoziierten Charakterisierung beitragen, aber durch die Eigenart des Untersuchungsobjektes, nämlich in einer Körperflüssigkeit zirkulierender, vom Primärtumor ausgelöster Krebszellen, auch zur krebspezifischen Charakterisierung herangezogen werden können. Hierzu zählen insbesondere die unten angegebenen, bevorzugten gewebsspezifischen Gene.

Darüber hinaus können auch prognostische Onkoproteine, wie anti-p53, pan p53 oder c-erb-B2, zur krebspezifischen Untersuchung herangezogen werden.

Die erfindungsgemäßen krebsassoziierten Gene umfassen ein breites Funktionsspektrum. Insbesondere geeignet sind gewebsspezifische, d. h. organotypische Gene, die Aussagen über die Herkunft der zirkulierenden Krebszellen zulassen, so daß auf die Lokalisation des Primärtumors, der Streuquelle, geschlossen werden kann; Gene, welche die Metastasierungsfähigkeit der Krebszellen kennzeichnen; Gene, die für Steroidhormonrezeptoren kodieren, so daß Aussagen über den Rezeptorstatus der Krebszellen möglich sind; Chemoresistenz-Gene; oder Gene, deren Expression mit der Modulation der Immunantwort sowie der Zellproliferation und Apoptose zirkulierender Krebszellen korreliert. Die Expression dieser krebsassoziierten Gene kann bei Krebszellen in charakteristischer Weise moduliert sein, so daß das resultierende Expressionsmuster auch einen Hinweis auf Krebs geben kann.

Krebsassoziierte gewebsspezifische Gene kodieren häufig für organotypische Marker, also Proteine bzw. Antigene, aufgrund derer sich auf die Herkunft der das Gen exprimierenden Zelle schließen läßt. Hierzu zählen beispielsweise Leber-spezifische Gene, wie Albumin oder AFP; Prostata-spezifische, wie AR, PSM oder PSA; Mamma-spezifische, wie  $\beta$ -hCG, OR, PR, Maspin oder BA46; Cervix-spezifische, wie SCCA-1; Colorectal-spezifische, wie CCK, Enteroglucagon, GLP, Gastrin, Motilin, PYY, MLI11 oder MSI12; Pankreas-spezifische, wie DPC4 oder PYY; Melanom-spezifische, wie MAGF1, MAGF3, Muc18 oder Tyrosinase; Schilddrüsen-spezifische, wie hTG; Lungen-spezifische, wie SF, SF-R, Surfactant-Proteine, beispielsweise SP-C, CC10, N-CoR oder RARB2; weitere gewebsspezifische Gene, wie CEA, TPA, Calcitonin, MUC1, Cytokeratine, insbesondere CK20, EG2 (transmembrane und extrazelluläre Domäne), Telomerase, verschiedene Translokationen, Stat5a, Varianten von Steroidrezeptoren (ÖR; AR) und verschiedene Gene, die ein LOH aufzeigen. Erfindungsgemäß bevorzugt sind RGP, CEA, PSM, PSA, AFP, Tyrosinase, MAGF3, Muc18, MUC1, CK20, Surfactant-Proteine und LOH-Untersuchungen in verschiedenen Chromosomenabschnitten durch zahlreiche Mikrosatelliten.

Natürlich kann zur gewebsspezifischen Charakterisierung auch auf Onkogene und/oder mutierte Tumorsuppressorgene zurückgegriffen werden, insofern sie auf bestimmte Formen von Krebs hinweisen. Beispiele hierfür sind tumorassoziierte Mutationen, wie Translokation 14; 18 (bcl-2) für Lymphome, Translokation 9; 22 (BCR/ABL) für chronische myeloische Leukämien, Translokation 15; 17 für akute nichtlymphozytäre Leukämien, Translokation 2; 13 (PAX3-FKTR) und Translokation 1; 13 (PAX7-FKTR) für alveolare Rhabdomyosarkome, Translokation 11; 22 für Ewing Sarkome, Translokation 12; 16 für myxoid Liposarkome, Translokation x; 18 für Synovialsarkome, BRCA-1 und BRCA-2 für Mammarkarzinome, DPC-4 für Pankreaskarzinome; erb-B für Glioblastome, MLH-1 und MSH-2 für HNPCC (hereditary nonpolyposis colon cancer), NF-2 für Neurofibromatose-1, NF-1 für Neurofibromatose, RET für Schilddrüsenkarzinome, RB für Retinoblastome, VHL für Nierenkarzinome, WT-1 für Nierentumoren, und k-ras für Colonkarzinome.

Die Charakterisierung der Metastasierungsfähigkeit zirkulierender Krebszellen nimmt erfindungsgemäß eine besondere Stellung ein. Zu diesem Zweck werden die Zellen insbesondere auf Gene untersucht, die für Angiogenese-, Wachstums- und Motilitätsfaktoren, Matrixdegradationsfaktoren, wie Proteasen und deren Hemmstoffe, oder Adhäsionsfaktoren, wie Adhäsine, kodieren.

Zu den Angiogenesefaktoren zählen beispielsweise a1-GF und b1-GF (saurer und basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) sowie deren Rezeptoren aFGF-R und bFGF-R, VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) und dessen Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2, sowie G12-AIF.

Zu den Wachstumsfaktoren zählen beispielsweise TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  (transformierender Wachstumsfaktor), IGF, IGF-BP3, erb-B (EGF-R), PDGF und EGF.

Zu den migrationsstimulierenden Motilitätsfaktoren zählen beispielsweise der Scatter-Faktor SL-L und dessen Rezeptor SL-R (c-met).

Die Proteasen und deren Hemmstoffe umfassen beispielsweise Matrix-Hydrolasen, wie MMP's (Matrix-Metalloproteasen), MT-MMP, UPA (Urokinase-artiger Plasminogenaktivator) oder deren Inhibitoren, wie PAI1 und PAI2 (Plasminogenaktivator-Inhibitor) oder TIMP's (Gewebeinhibitoren von Metalloproteasen).

Zu den Adhäsinen zählen Adhäsionsproteine, wie Cadherine, beispielsweise E-Cadherin, Catenine, beispielsweise  $\beta$ -Catenin, Selectine, beispielsweise E-, P- und L-Selectin sowie deren Rezeptoren, CD44 (Standard- und Splice-Varianten), Integrine und ICAM's.

Erfindungsgemäß bevorzugte Gene zur Charakterisierung der Metastasierungsfähigkeit sind Angiogenesefaktoren (bFGF und bFGF-R's), Proteasen (UPA; PAI; MMP's; TIMP's), Adhäsine ( $\beta$ -Cadherin;  $\alpha$ -Catenin;  $\beta$ -Catenin; Selectin-L und -R; CD44), Motilitätsfaktoren SL-L und c-met und Metastase-Suppressor nm23.

Von den Steroidhormonrezeptor-Genen kommen erfindungsgemäß bevorzugt die Gene zur Anwendung, die für den Östrogen-, Progesteron- oder Androgen-Rezeptor (ÖR, PR oder AR) kodieren.

Auch die Charakterisierung von Chemoresistenz-Genen zirkulierender Krebszellen ist erfindungsgemäß von besonderer Bedeutung, da Krebszellen häufig gegen Therapeutika, zum Teil auch mehrfach, resistent sind und eine Charakterisierung dieser Gene zur Bewertung der Erfolgchancen bestimmter Krebstherapien beitragen kann. Beispiel für solche Chemoresistenz-Gene sind MDR1, das für das P-Glykoprotein kodiert, nm23, hMLH1, gp170, MRP1, das 'I'psoisomerase-Gen, das Glutathion-S-Transferase-pi-Gen, das LRP-Gen und Gene, die für  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubuline kodieren.

Erfindungsgemäß bevorzugt untersuchte Chemoresistenz-Gene sind MDR1, MRP1, das Topoisomerase II-Gen, das LRP-Gen und das Glutathion-S-Transferase-pi-Gen.

Zur Charakterisierung einer Modulation der Immunantwort kann sich beispielsweise der Bewertung der T- und NK-zellvermittelten Cytotoxizität und/oder antikörperabhängigen zellvermittelten Cytotoxizität (ADCC) bedienen. Zu diesem Zweck kann man immunologische Effektorzellen, insbesondere NK-, T11/112- und CD8-Zellen auf der einen Seite und zirkulierende Krebszellen auf der anderen Seite beispielsweise auf das TNF- $\alpha$ -Gen (Tumornekrose-Faktor), Gene, die für Interferon, beispielsweise  $\alpha$ - und  $\gamma$ -IFN kodieren, FAS-Liganden- und FAS-Rezeptoren-Gene, Perforin 1, bcl-2, bax und Granzyme untersuchen.

Bevorzugt sind FAS und FAS-L, Perforin und Granzyme.

Die Proliferations- und Apoptoseeigenschaften zirkulierender Krebszellen werden erfindungsgemäß anhand von Genen untersucht, die mit dem Proliferations- und Apoptosestatus von Zellen, insbesondere von Krebszellen, korrelieren. Dazu zählen unter anderen auch einige der oben genannten Onkogene bzw. Proto-Onkogene und Tumorsuppressor- bzw. mutierten Tumorsuppressor-Gene, die über die krebspezifische Charakterisierung hinaus aufgrund ihres Expressionsmusters auch zur krebsassoziierten Charakterisierung beitragen können. Erfindungsgemäß wird beispielsweise auf p53, durch p53 sequenzspezifisch transkriptional aktivierte (Bax, FAS-1, und -R, Cycline A, B1, D1, D3, E oder G; GADD45; GID-AD; IIC1; IIC-DF3; mdm2; p21) und inaktivierte Gene (bcl-2; c-myc; bFGF; c-fos; IIST70; IL-6; MDR1; PCNA), zu Beginn der Apoptose und des Zellzyklusarrestes exprimierte Gene (außer p53 noch TNF- $\alpha$ , TNF-R1, TNF-R2, DPC-4, ILN-y und FAS-L und -R) sowie Gene, die bei unreguliertem Wachstum vorkommen, wie erb-B2, EGF und sonstige autokrine Wachstumsfaktoren (TGF- $\alpha$ ; PDGF) zurückgegriffen. Bevorzugt sind Bax, FAS, Cycline, mdm2, p21, p16, bcl-2, c-myc, FGF, MDR1, TNF- $\alpha$ , ILN-y, erb-B2, EGF und sonstige autokrine Wachstumsfaktoren.

Die Untersuchung einer Körperflüssigkeit kann durch Anwendung bekannter immunologischer Verfahren vorgenommen werden. Hierzu zählen beispielsweise Immunoprecipitations- und Kompetitionsexperimente, Immunofluoreszenz, immunohistochemische Färbeverfahren, Western-Blotting, Durchflußzytometrie, ELISA u. ä. sowie massenspektrometrische Verfahren. Da immunologische Verfahren in der Regel auf bestimmte Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen abstellen, dienen solche Verfahren vorzugsweise zur Untersuchung der Körperflüssigkeit auf Proteine, wobei es sich insbesondere um Proteine handelt, die von den vorstehend beschriebenen Genen exprimiert werden. Zu diesem Zweck eventuell benötigte Antikörper sind dem Fachmann entweder bekannt oder können nach üblichen Verfahren erhalten werden. Erfindungsgemäß werden immunologische Verfahren bevorzugt zur Untersuchung von Blut und insbesondere von Knochenmark eingesetzt. Mit immunologischen Verfahren lassen sich vorteilhafterweise z. B. folgende Proteine analysieren: p53, erb-B2 und Tumorantigene mittels ELISA und ähnlicher Verfahren; FAS-Ligand und FAS-Rezeptor, Phosphatidylinositol, Cytokine, Perforin, Cytokeratine und Cycline mit Hilfe von Immunphänotypisierung.

Eine weitere Möglichkeit zur erfindungsgemäßen Untersuchung von Körperflüssigkeiten bietet die Nukleinsäureanalyse. Hierzu gehören beispielsweise Untersuchungen von DNA oder RNA, insbesondere mRNA, mit Hilfe von Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, wie Sequenzierungstechniken, Hybridisierungstechniken, beispielsweise Northern- oder Southern-Blotting, Hybridisierung auf Microchips, insbesondere Verfahren, die auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) beruhen und auch Techniken, bei denen die zu untersuchende DNA oder RNA zunächst in-vitro transkribiert und/oder translatiert wird. Erfindungsgemäß kann jede Körperflüssigkeit mit Hilfe einer Nukleinsäureanalyse untersucht werden. Vorteilhafterweise greift man auf Blut zurück, insbesondere dann, wenn mRNA untersucht wird. Zur Untersuchung eines Gens können natürlich auch mehrere Nukleinsäureanalysen eingesetzt werden. Auch eine Kombination aus immunologischen Verfahren und Nukleinsäureanalysen kann von Vorteil sein.

Viele der krebspezifischen und krebsassoziierten Gene werden vorzugsweise anhand von mRNA untersucht. Eine zu diesem Zweck angewandte Technik ist die direkte Hybridisierung von mRNA und/oder cDNA (qualitativ/quantitativ) auf einer soliden Matrix (z. B. in Form von Microchips) mit immobilisierten Oligonukleotiden bzw. immobilisierten Streptavidin und biozylierten Oligonukleotiden. Auf diesen werden mRNA, cDNA oder doppelsträngige PCR-Produkte hybridisiert. Für die Einführung des Signals stehen verschiedene Wege zur Verfügung, z. B. Primerextension durch markierte dNTP und ddNTP. Entsprechend der Markierung wird das Detektions-Prinzip gewählt: Radioaktivität, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz.

Insbesondere bedient man sich einer bekannten Technik, welche die reverse Transkription (RT) und die Polymerasekettenreaktion (PCR) kombiniert und im folgenden als RT-PCR bezeichnet wird. Bei diesem Verfahren wird zunächst die mRNA aus einer erfindungsgemäßen Körperflüssigkeit isoliert. Diese wird dann mit Hilfe der reversen Transkriptase zu cDNA umgeschrieben, welche in Folge mit Hilfe der PCR amplifiziert wird. Die so erhaltenen PCR-Produkte können dann entweder einer Fragmentanalyse, ggf. nach geeigneter Aufreinigung, zugeführt, direkt oder indirekt über weitere Klonierungszyklen sequenziert werden oder auch in-vitro exprimiert werden. Die Quantifizierung der untersuchten mRNA's erfolgt über verschiedene interne Kontrollen, vorzugsweise in Form von Zelläquivalenten oder klonierten cDNA's bzw. cRNA's durch fluoreszenzmarkierte Primer, durch "real-time"-PCR oder durch RNA-Hybridisierung auf Microchips. Die zellspezifische Quantifizierung von Genen erfolgt über interne Standards, insbesondere vom Zelltyp unabhängige RNA (cDNA), die z. B. für GAPDH,  $\beta$ -Mikroglobulin, 1.32 oder  $\beta$ -Actin kodiert. Die Spezifität wird durch umfangreiche Kontrollen abgesichert, wie Mismatch-Proben oder die Sequenzierung der cDNA.

Bei den krebspezifischen Genen, die bevorzugt anhand von mRNA-Analysen an Körperflüssigkeiten charakterisiert werden, handelt sich insbesondere um Gene, die bei Nicht-Krebszellen in der untersuchten Körperflüssigkeit im wesentlichen nicht exprimiert werden, z. B. folgende: CEA, F5M, MUC1 (tumorspezifische Splice-Variante), ALP, Cytokeratin, Tyrosinase, MAG-E3, MUC18, tumorspezifische Splice-Varianten des Östrogen- und Androgen-Rezeptors, und EGF.

Krebsassoziierte Gene werden in der Regel bevorzugt anhand von mRNA-Analysen an Körperflüssigkeiten charakterisiert. Hierzu zählen insbesondere folgende Gene: bFGF, hFGF-R, VEGF, VEGF-R's, MMP's, TIMP's, MDR1, MRP, LRP, Topoisomerase II, Glutathion-S-Transferase, Progesteron-Rezeptor, Bax, bcl-2, FAS, mdm2, p21, p16, c-myc, TNF- $\alpha$ , IFN-y, erb-B2 und EGF.

Eine DNA-Analyse, insbesondere die Sequenzierung von DNA, ist der Regel für die Untersuchung auf Onkogene und/oder mutierte Tumorsuppressor-Gene bevorzugt und kann insbesondere bei der Charakterisierung folgender Gene von Vorteil sein: p53, ras-Familie, erb-B2, c-myc, mdm2, BRCA1, BRCA2, FAP, MSI2, M111 und RIT.

Erfindungsgemäß können Körperflüssigkeiten in dem Zustand analysiert werden, in dem sie gewonnen wurden. Allerdings kann es von Vorteil sein, die Proben durch zusätzliche Maßnahmen auf die nachfolgende genetische Untersuchung vorzubereiten. So können beispielsweise anstelle von Blut bestimmte davon abgeleitete Flüssigkeiten oder Zellkonzentrate, beispielsweise der sogenannte Buffy-Coat oder Zellfraktionen nach Dichtezentrifugation, vorteilhafterweise verwendet werden. Darüber hinaus kann bei der Untersuchung bestimmter Gene eine Isolierung der zirkulierenden Krebszellen entscheidende Vorteile bezüglich der Nachweisgrenze der zu untersuchenden Gene mit sich bringen.

Zur Isolierung von Krebszellen können bekannte Verfahren eingesetzt werden, beispielsweise physikalische Verfahren wie Mikro-Filtration oder Dichtegradientenzentrifugation, oder antigenspezifische Immunabsorptionsverfahren, bei de-

nen spezifische Antikörper die Krebszellen derart markieren, daß sie anschließend aussortiert werden können. Geeignete Antikörper sind beispielsweise mit fluoreszierenden und insbesondere magnetischen Markern versehen, so daß bei Verwendung eines derart markierten krebszellenspezifischen Antikörpers Krebszellen nach Bindung solcher Antikörper in sogenannten Zellsortern isoliert werden können. Zur Auswahl geeigneter Antikörper zu Isolierungszwecken bestimmter Krebszellen kann man auf die Charakterisierung und Identifizierung dieser Krebszellen ohne vorherige Isolierung zurückgreifen. Vorzugsweise werden die Krebszellen in lebensfähigem und insbesondere vermehrungsfähigem Zustand isoliert. Insbesondere die mRNA sollte für die oben beschriebenen Untersuchungen intakt sein.

Die nach einer Separation erhaltenen Zellfraktionen müssen dann gegen Zelltyp-unabhängige Marker (beispielsweise GAPDH,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, L32 oder  $\beta$ -Actin) quantifiziert werden. Ein weiterer Reinheitsnachweis kann durch RNA erfolgen, die für MNCs (mononukleare Zellen) spezifisch ist (Perforin, CD45). Die nach Separation erhaltenen verschiedenen Zellfraktionen (Fraktion A: MNC einschließlich der Tumorzellen; Fraktion B: MNC nach der Entfernung der Tumorzellen; Fraktion C: aufgereinigte Tumorzellen) können dann auch miteinander verglichen werden. Weiterhin kann durch eine sogenannte Einzelzell-PCR durch Genomamplifikation ein verändertes Genom einer einzelnen entarteten Zelle analysiert werden.

Die Isolierung zirkulierender Krebszellen wird vorteilhafterweise für die Charakterisierung von Genen durchgeführt, die auch von Nicht-Krebszellen in der untersuchten Körperflüssigkeit exprimiert werden, z. B. folgenden Genen:

DNA: p53, ras-Familie, erb-B2, c-myc, mdm2;

RNA: bFGF, bFGF-R, VEGF-R's, MMP's, TIMP's, MDR1, MRP, LRP, Topoisomerase, Glutathion-S-Transferase, Bax, bcl-2, FAS, mdm2, p16, c-myc, IGF1, MDR1, TNF- $\alpha$ , IL-N-y und EGF, AR, OR, EGFP und SE.

Bestimmte erfindungsgemäße Untersuchungen werden bevorzugt an Zellkulturen vorgenommen. Dazu kann man die zirkulierenden Krebszellen in der oben beschriebenen Weise isolieren und anschließend unter geeigneten Bedingungen kultivieren. Insbesondere Aussagen zur Modulierung der Immunantwort durch Krebszellen oder der Proliferation dieser Zellen lassen sich an in-vitro Kulturen treffen.

Gene, die vorteilhafterweise an in-vitro kultivierten Krebszellen charakterisiert werden, sind z. B. folgende: Bax, FAS, Cyclin, mdm2, p21, p16, bcl-2, c-myc, IGF1, MDR1, TNF- $\alpha$ , IL-N-y, erb-B2 und EGF.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich unabhängig vom Stadium eines Krebses anwenden. Es kann allein oder in Kombination mit anderen Krebsdiagnoseverfahren, wie bildgebenden oder auf herkömmlichen Tumormarkern basierenden Verfahren, eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Prävention, beim Auftreten erster Warnzeichen für Krebs oder beispielsweise nach einer Therapie eines Krebses zur Rezidiv-Früherkennung eingesetzt werden. Es eignet sich zur Charakterisierung und Identifizierung sämtlicher Krebsformen, soweit entsprechende zirkulierende Krebszellen in den untersuchten Körperflüssigkeiten vorhanden sind. Hierzu gehören beispielsweise Abdominalkrebs, Analkrebs, Beckenkrebs, Blasenkrebs, Brustkrebs (Mamma), Dickdarmkrebs (Colon; Rectum), Eileiterkrebs (Ovar), Gallengangkrebs, Gebärmutterkrebs, Gebärmutterhalskrebs (Cervix), Gebärmutter-schleimhautkrebs, Gehirnkrebs, Kopf- und Nackenkrebs, Leberkrebs, Lippenkrebs, Lungenkrebs, Magenkrebs, Mundkrebs, Nierenkrebs, Pankreaskrebs, Pfortaderkrebs, Prostatakrebs, Schilddrüsenkrebs, Zungenkrebs, Leistenkrebs, Weichteilkrebs, Lymphome, beispielsweise das Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), Leukämien, beispielsweise die chronische myeloische Leukämie, multiple Leukämien, Melanome und verschiedene Sarkome.

Besonders vorteilhaft läßt sich das erfindungsgemäße Verfahren bei der Charakterisierung und Identifizierung von zirkulierenden Krebszellen anwenden, die auf eine oder mehrere der folgenden Krebsarten zurückzuführen sind: Mammarkarzinome, Sarkome, Ovarkarzinome, Lungenkarzinome, Pankreaskarzinome, Colonkarzinome, Rectumkarzinome, Prostatakarzinome, Leberkarzinome, Melanome, Non-Hodgkin-Lymphome und chronische myeloische Leukämien.

Insbesondere interessant ist der Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens bei lymphknotenfreien Krebsformen, da in diesem Fall herkömmliche, auf der Untersuchung von Lymphknoten basierende Verfahren versagen. Werden zirkulierende Krebszellen bei NO-Tumoren (beispielsweise einem Mamma- oder Colonkarzinom) nachgewiesen, sind aufgrund der besonderen Konstellation gezielte Aussagen zur Therapiewahl möglich. So ist in diesen Fällen vorzugsweise eine adjuvant-kurative Therapie angezeigt, bei fortgeschrittenen Tumoren gegebenenfalls mit einer nachgeschalteten zusätzlichen immunomodulatorischen Therapie.

Die erste Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens richtet sich auf den Nachweis zirkulierender Krebszellen. Zu diesem Zweck wird vorzugsweise die Expression krebspezifischer Gene gemessen. Besonders bevorzugt sind Multiparameter-Expressionsanalysen solcher Genen, die bei Nicht-Krebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit abgelesen sind. Diese Analysen können bis zu etwa 40 Gene umfassen. In der Regel werden bis zu etwa 25 Gene, vorzugsweise etwa 2 bis 10 Gene und insbesondere etwa 3 bis 7 Gene charakterisiert, die man bevorzugt unter den folgenden auswählt:

hCG, hTG, Calcitonin, Albumin, Surfactant-Proteine, Telomerase, verschiedene Translokationen, Stat5a, Varianten von Steroidrezeptoren (OR, AR), Progesteron-Rezeptor, verschiedene Gene, die ein LOH aufzeigen, CEA, PSM, PSA, AFP, Tyrosinase, MAGE3, Muc18, MUC1, Cytokeratine, insbesondere CK20,

LOH-Untersuchungen in verschiedenen Chromosomenabschnitten durch zahlreiche Mikrosatelliten, Magen-Darm-Trakt-Hormone, wie Motilin, Entero glucagon, GIP, Gastrin, CCK oder PYY, und Neurensin. Vorzugsweise werden die entsprechenden mRNA's, insbesondere durch RT-PCR, analysiert.

Besonders effektive Kombinationen umfassen die Gene CEA und CK20, wobei die Analyse der entsprechenden mRNA's bevorzugt ist. Diese Kombinationen können gegebenenfalls durch eine Untersuchung auf MUC1 vorteilhaft ergänzt werden, wobei man insbesondere die Relation zwischen der tumorspezifischen 336BP-Splicevariante und der natürlichen 309BP-Splicevariante analysiert. Derartige Untersuchungen sind besonders zum Nachweis zirkulierender Krebszellen vom Karzinomtyp brauchbar. Bevorzugt sind in diesem Zusammenhang gynäkologische Karzinome, wie Ovar-, Mamma- oder verschiedene Gebärmutterkarzinome, sowie Colon- und Prostatakarzinome.

Weitere effektive Kombinationen umfassen das MAGE3- und Tyrosinase-Gen, wobei die Analyse der entsprechenden mRNA's bevorzugt ist. Diese Kombinationen können gegebenenfalls durch eine Untersuchung auf Muc18 vorteilhaft ergänzt werden. Derartige Untersuchungen sind insbesondere zum Nachweis zirkulierender Krebszellen vom Melanomtyp



brauchbar.

Die vorstehend genannten Expressionsanalysen können durch weitere Nachweisverfahren krebsspezifischer Gene ergänzt werden. Zu diesem Zweck werden vorzugsweise Untersuchungen auf Onkogene und/oder mutierte Tumorsuppressor-Gene angestellt, wobei insbesondere auf die oben genannten erfindungsgemäß bevorzugten Gene dieser Art zurückgegriffen werden kann. Derartige Analysen, insbesondere zum Nachweis bestimmter Mutationen, werden vorteilhafterweise auf DNA-Ebene, beispielsweise durch DNA-Sequenzierung oder Hybridisierungstechniken durchgeführt und können bis zu etwa 40 Gene umfassen. In der Regel werden bis zu etwa 20 Gene, vorzugsweise etwa 2 bis 10 Gene und insbesondere etwa 3 bis 7 Gene charakterisiert.

Besonders effektive Kombinationen umfassen die Gene p53 und erb-B2. Dabei wird p53 vorzugsweise anhand der entsprechenden cDNA auf Mutationen und erb-B2 vorzugsweise auf DNA-Ebene auf Amplifikationen untersucht. Diese Kombinationen können gegebenenfalls durch Untersuchungen auf c-myc und/oder K-ras vorteilhaft ergänzt werden, wobei c-myc bevorzugt auf DNA-Ebene auf Amplifikation und K-ras auf Mutationen untersucht wird.

Diese erste Anwendung kann dadurch ergänzt werden, daß man die zirkulierenden Krebszellen auf Gene untersucht, die Aussagen über deren Ursprung zulassen, d. h. eine Organlokalisation der Streuquelle erlauben. Dies kann auch in Form von Multiparameter-Expressionsanalysen geschehen, bei denen organotypische Morphogene gemessen werden. Solche Analysen können bis zu etwa 36 Gene umfassen. In der Regel werden bis zu etwa 14 Gene, vorzugsweise etwa 1 bis 8 und insbesondere 2 bis 5 Gene charakterisiert, die man bevorzugt unter den folgenden auswählt: hCG, hTG, Calcitonin, Albumin, Surfactant-Proteine, CC10, RAR $\beta$ 2-Rezeptor, N-CoR, verschiedene Translokationen, Stat5a, Varianten von Steroidrezeptoren (OR, AR), Maspin, BA46, Progesteron-Rezeptor, verschiedene Gene, die ein LOH aufzeigen, PSM, PSA, AFP, Tyrosinase, MAGI3, Muc18, MUC1 (tumorspezifische Splice-Variante vs. Wildtyp-Variante), LOH-Untersuchungen in verschiedenen Chromosomenabschnitten durch zahlreiche Mikrosatelliten und die oben genannten 6 Magen-Darm-Trakt-Hormone.

So spricht z. B. der Nachweis von GIP, PYY, Gastrin und/oder Motilin für ein kolorectales Karzinom, der Nachweis von PSA und/oder PSM deutet auf ein Prostatakarzinom hin, die Messung von Albumin und/oder alpha-Fetoprotein weist auf ein Leberkarzinom hin, und die Expression von Maspin, BA46 und/oder Progesteron-Rezeptor deutet ein Mammakarzinom an. Die alveolarepithelspezifischen SP-C- und CC10-Transkripte hingegen stellen organspezifische Nachweise für Lungenkarzinome, insbesondere des NSCLC (nichtkleinzellige Lungenkarzinom) dar. Der RAR $\beta$ 2-Rezeptor und dessen Corepressor N-CoR werden als Differenzierungsnachweis für die Charakterisierung und Identifizierung von Lungenkarzinomen epithelialer Herkunft verwendet. Es kann allerdings auch auf Onkogene zurückgegriffen werden, deren Mutation auf bestimmte Formen von Tumoren hinweisen (beispielsweise k-ras bei Colonkarzinomen oder weitere, oben aufgezählte tumorspezifische Mutationen).

Besonders effektive Kombinationen umfassen die Maspin- und/oder PR-Gene insbesondere für den Nachweis von Mammakarzinomen, wobei vorzugsweise die entsprechenden mRNA's analysiert werden.

Weitere besonders effektive Kombinationen umfassen die PSM- und/oder PSA-Gene insbesondere für den Nachweis von Prostatakarzinomen, wobei vorzugsweise die entsprechenden mRNA's analysiert werden.

Weitere besonders effektive Kombinationen umfassen das Gastrin-Gen insbesondere für den Nachweis von Colonkarzinomen, wobei vorzugsweise die entsprechende mRNA analysiert wird.

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Erstellung eines Risikoprofils nachgewiesener zirkulierender Krebszellen, aufgrund dessen eine Prognose gestellt werden kann. Zu diesem Zweck werden vorzugsweise die Metastasierungseigenschaften dieser Krebszellen bewertet.

Das Risikopotential des Tumors ist außerdem durch die Analyse von Mutationen und Amplifikationen und/oder verstärkter/verminderter Expression bestimmter Gene zu beschreiben, welche das Wachstumsverhalten der Krebszellen beeinflussen (z. B.: c-myc, c-erb-B2, c-fos, c-erb-B, mdm2, nm23, p16, p21).

Ein weiterer wichtiger Faktor zur Risikoeinschätzung ist die Empfindlichkeit des Tumors gegen immunologische Attacken des betroffenen Organismus. Viele Effektormechanismen bedingen die Apoptose der Zielzelle (Tumorzelle). Wenn ein Tumor diesen Abwehrmechanismen widersteht, ist das für diesen ein enormer Vorteil. Apoptose-relevante Gene können anzeigen, inwieweit ein Tumor gegen die Attacken der Abwehrzellen resistent oder empfindlich ist, oder eventuell sogar selbst Attacken gegen die Effektorzellen auslösen kann (z. B.: Perforin, Granzym, hax, bcl-2, fas, fas-L, GADD45, p53, TNF-R1, TNF-R2).

Von ebenso wichtiger Bedeutung ist die Quantifizierung der Tumorzellen im Blut. Es ist entscheidend, ob sich die Anzahl zirkulierender Tumorzellen vor und nach operativem Eingriff oder Therapie unterscheiden. Eine Quantifizierung der Krebszellen anhand der oben angegebenen krebsspezifischen Gene mit Hilfe von Longitudinalstandards erlaubt eine solche Aussage.

Zur Erstellung eines solchen Risikoprofils werden Multiparameter-Expressionsanalysen bevorzugt. Diese können bis etwa 50 Gene umfassen. In der Regel werden bis zu etwa 25 Gene, vorzugsweise etwa 2 bis 15 Gene und insbesondere etwa 4 bis 12 Gene charakterisiert, die man vorzugsweise unter den folgenden auswählt: p53, durch p53 sequenzspezifisch transkriptional aktivierte (Bax, FAS-L und -R, Cyclin A B1, D1, D2, D3, E oder G, GADD45, GID-AIF, HIC1, KIL-IP3, mdm2, p21) und inaktivierte Gene (bcl-2, c-myc, IGF1, c-fos, HSP70, IL-6, MDR1, PCNA), zu Beginn der Apoptose und des Zellzyklusarrestes exprimierte Gene (außer p53 noch TNF- $\alpha$ , TNF- $\gamma$  und FAS) sowie Gene, die bei unreguliertem Wachstum vorkommen, wie erb-B2 und EGF; Angiogenesefaktoren (aFGF, bFGF, aFGF-R, bFGF-R, VEGF, VEGF-R1 und VEGF-R2, sowie GD-AIF); Proteasen und deren Gegenspieler (UPA, PAI, MMPs, TIMPs); Adhäsine (E-Cadherin,  $\alpha$ -Catenin,  $\beta$ -Catenin, Selectine, CD44) und Motilitätsfaktoren (SP).

Zur Risikoabschätzung insbesondere bevorzugt ist die Bewertung der Metastasierungseigenschaften; man stellt dabei vorzugsweise auf die Fähigkeit der Krebszellen zur Matrixdegradation und zur Steuerung der Angiogenese ab. In diesem Zusammenhang greift man insbesondere auf die oben genannten Angiogenesefaktoren und/oder Proteasen sowie deren Gegenspieler zurück.

Besonders effektive Kombinationen umfassen bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R1 und/oder VEGF-R2, wobei bevorzugt die entsprechenden mRNA's untersucht werden. Diese Kombinationen können gegebenenfalls durch Untersuchungen



gen auf MMP's, insbesondere MMP2, und/oder TIMP's, insbesondere TIMP3, ergänzt werden, wobei man auch hier bevorzugt die entsprechenden mRNA's untersucht.

Weitere effektive Kombinationen umfassen die FAS-Ligand- und FAS-Rezeptor-Gene, die vorzugsweise anhand der entsprechenden mRNA's untersucht werden.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß sich individuelle Risikoprofile für einzelne Patienten erstellen lassen. Da das Verfahren insbesondere zur kontinuierlichen Anwendung geeignet, d. h. jederzeit wiederholbar ist, können anhand der Veränderung solcher Risikoprofile wertvolle Aussagen über die Entwicklung eines Krebses für einen individuellen Patienten getroffen werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß somit nicht auf Statistiken zurückgegriffen werden muß, die im allgemeinen auf Erhebungen beruhen, bei denen Patienten mit sehr unterschiedlichen Voraussetzungen gemittelt werden.

Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Therapie eines nachgewiesenen Krebses. So lassen sich Aussagen zur Therapiewahl, -kontrolle und -resistenz treffen.

Für die Therapiewahl sind Fragestellungen wichtig, welche die Therapieform oder die Medikamentenwahl betreffen. Hierzu gehören beispielsweise Entscheidungen, ob kurativ oder palliativ, adjuvant oder risiko-adaptiert therapiert werden soll, sowie die Beurteilung der Wirksamkeit einer Anti-Krebstherapie. Beispielsweise lassen sich Anti-Krebsmittel (Cytostatika), die zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen, auf ihre Wirksamkeit prüfen, indem man apoptoseassoziierte Gene untersucht. Insbesondere eignen sich diesem Zweck die Analyse verschiedener mRNA's oben beschriebener apoptoseassoziiierter Gene. Diese Tests werden vorzugsweise an zirkulierenden Krebszellen durchgeführt, die in vitro kultiviert werden. Dem Patienten müssen somit keine Cytostatika verabreicht werden. Vorzugsweise werden zu diesem Zweck mRNA's von z. B. folgenden Genen untersucht: p53, die durch p53 sequenzspezifisch transkriptional aktivierten (Bax, FAS/Apo1, Cycline A B1, D1, D2, D3, B oder G, GADD45, CD-40, IIC1, IGF BP3, mdm2, p21) und inaktivierten Gene (bcl-2, c-myc, FGF, c-fos, HSP70, H-rb, MDR1, PCNA.), zu Beginn der Apoptose und des Zellzyklusarrestes exprimierte Gene (außer p53 noch TNF-alpha, IFN-gamma und FAS) sowie Gene, die bei unreguliertem Wachstum vorkommen, wie erb-B2 und EGf.

Grundsätzlich können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren alle Anti-Krebstherapien bewertet werden. Hierzu zählen beispielsweise Vaccine, Immunmodulation, molekulare Therapien, wie Gen-Replacement, Antisense-Nucleotide, Ribozyme, monoklonale Antikörper, MMP-Inhibitoren und attenuierte Viren, z. B. EBV attenuierte Viren zur Cytozyse p53-positiver Krebszellen.

Da das erfindungsgemäße Verfahren auf molekularbiologischen Untersuchungen beruht, eignet es sich in hervorragender Weise dazu, Information bezüglich der Therapiewahl zu liefern, die der molekularen Ausstattung der untersuchten Krebszellen angepaßt sind.

Es ist davon auszugehen, daß eine erfolgreiche Anti-Krebstherapie zur Abnahme und günstigstenfalls zum vollständigen Verschwinden zirkulierender Krebszellen und/oder zum Verlust von Risikofaktoren führt. Spricht eine Krebsform auf eine bestimmte Therapie nicht an, ist in der Regel davon auszugehen, daß die Zahl der zirkulierenden Krebszellen nicht ab-, sondern ggf. zunimmt oder daß sich das patientenspezifische Risiko vergrößert. Es ist somit möglich, den Verlauf einer Krebserkrankung bzw. deren Therapie durch wiederholte Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zu bewerten. Durch einen zeitabhängigen Vergleich können somit die Wirksamkeit einer Therapie beurteilt und auf einfache Weise auch Resistenzen gegenüber bestimmten Therapien erkannt werden. Deren Auftreten kann darüber hinaus durch Untersuchungen zirkulierender Krebszellen auf Chemoresistenz-Gene nach Applikation Therapeutika an den Patienten bestätigt werden.

Die Analyse verschiedener Zielgene bestimmter Therapeutika, wie EGf (Antikörper gegen epitheliales Antigen) c-erb-B2 (Anti-erb-B2-Antikörper-Mustard Komplex), MMP (Anti-Protease-Therapie), PR und OR (Anti-Hormon-Therapie) bcl-2 (Anti-bcl-2-Therapie) oder Topoisomerase II (Doxorubicin u. a.) können Aussagen über die spezifische Wirkung der Substanzen erlauben, indem die "Targetparameter" direkt quantifiziert werden. Der Erfolg einer cytostatischen Therapie mit mikrotubulinstabilisierenden Taxanen (z. B. Taxol) kann durch den Nachweis der RNA-Expression der monomeren Targetmoleküle ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubuline), deren Assembly unter Taxol verhindert wird, vorhergesagt werden. Eine Resistenz von Krebszellen gegen Cytostatika (z. B. Cisplatin) kann durch den Verlust der Expression von DNA-Reparaturgenen (z. B. hMLH1) nachgewiesen werden. Weiterhin kann durch die Titrierung von in-vitro Systemen an patienteneigenen Tumorzellen direkt die Wirkung verschiedener Therapeutika getestet werden, um auf diese Weise die bestmögliche Behandlungsform zu ermitteln.

Besonders effektive Kombinationen zur Beurteilung einer möglicherweise bestehenden Chemoresistenz umfassen die Gene MDR1, MRP, Topoisomerase II und Glutathion-S-Transferase-p1, wobei man beispielsweise die entsprechenden mRNA's mißt. Bezüglich der MDR1-Untersuchung greift man auch häufig auf die Analyse der MDR1-Pumpe-gp170 und/oder den MDR1-Flux-Doxorubicin-Test zurück.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß derartige therapierefraktäre Zellen (minimal residual disease; MRD) charakterisiert und identifiziert werden können und in Anlehnung daran ein schon ausgeführter Therapieansatz risikoadaptiert erweitert werden kann, um die residuellen Krebszellen vollständig zu eliminieren.

Obwohl das erfindungsgemäße Verfahren bis hierhin in erster Linie im Hinblick auf die Charakterisierung humaner Gene beschrieben worden ist, soll es nicht darauf beschränkt sein. Vielmehr erschließen sich dem Fachmann eine Reihe weiterer Anwendungen, wie die in Tiermodellen zur Beantwortung von Fragestellungen, die den obigen entsprechen oder zumindest ähnlich sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Derartige Mittel sollten möglichst einfach handhabbar und im wesentlichen gebrauchsfertig sein. Vorteilhaft verwendet man die Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in Kit-Form, beispielsweise als Test- und/oder Diagnostikum. Ein solcher Kit beinhaltet wenigstens ein Kompartiment, beispielsweise ein Vial oder Teströhrchen, in dem die Mittel zur erfindungsgemäßen Untersuchung auf obige Gene möglichst in aliquotierten Mengen enthalten sind. Üblicherweise umfaßt der Kit mehrere Kompartimente, wobei ein Kompartiment der Untersuchung auf ein bestimmtes Gen dienen kann, aber auch Mittel umfassen kann, die zur Untersuchung mehrerer Gene verwendet werden können. Unter Um-

## DE 197 36 691 A 1

ständen können auch mehrere Kompartimente der Untersuchung auf ein bestimmtes Gen dienen. Gegebenenfalls umfaßt der Kit auch ein weiteres Kompartiment zur Aufnahme der Körperflüssigkeitsprobe. Der Kontakt der Körperflüssigkeitsprobe mit den Mitteln zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann gegebenenfalls in einem weiteren Kompartiment stattfinden. Die Wahl der Mittel richtet sich nach den untersuchten Genen und der gewählten Methode. Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

### Beispiel 1 (Diagnostische Fragestellung)

#### a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin bestand eine Mastopathie mit Verdacht auf ein Mammakarzinom. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

#### b) Fragestellung

Gibt es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten?

#### c) Untersuchungen

Zur krebspezifischen Charakterisierung wurden isolierte Krebszellen auf p53-Mutationen und Amplifikation von erb-B2 und c-myc untersucht. Zum Nachweis von Epithelzellen im Blut wurde der Gehalt an CK20-mRNA molekularbiologisch mit einer Sensitivität von mehr als 1 Zelle auf  $10^6$  Leukozyten organspezifisch (Ovar, Colon > Mamma) bestimmt. Außerdem wurde die Blutprobe auf CEA-mRNA untersucht. Dieser Nachweis von Zellen, die das onkogene Adhärenz-CEA bilden, wurde mit einer Sensitivität von einer Krebszelle auf  $10^6$  Leukozyten geführt. Ferner wurde eine Bestimmung der MUC1-mRNA vorgenommen, um die karzinomspezifische Mucin-Transkription zu beurteilen.

Zur krebsassoziierten Charakterisierung untersuchte man die Blutprobe zunächst auf Angiogenesefaktoren, indem man den Gehalt an bFGF-mRNA und bFGF-R-mRNA sowie VEGF-mRNA und VEGF-R-mRNA's bestimmte. Die Metastasierungsfähigkeit wurde ferner charakterisiert, indem man die Genexpression einer Proteinase (MMP2) und eines physiologischen Gegenspielers dieser Proteinase (TIMP3) analysierte. Der Nachweis von Steroidhormonrezeptor exprimierenden, zirkulierenden Zellen wurde über die Progesteron-Rezeptor-Transkription geführt. Weiterhin wurde die Probe auf Maspin-mRNA untersucht.

Diese Untersuchungen wurden an Zellfraktionen des Buffy-Coats vorgenommen. Zunächst wurde die Fraktion A gewonnen, die überwiegend aus mononukleären Zellen (MNC's) und Epithelzellen, (EC's) bestanden. Aus dieser Fraktion A wurden dann die Fraktionen B (MNC's) und C (EC's) gewonnen. Als Reinheitsmarker der aufgereinigten Fraktion C wurde Perforin-mRNA gemessen, welches von Lymphozyten exprimiert wird.

# DE 197 36 691 A 1

## d) Resultate

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
p53-Mutation in Tumorzellen	Es konnten keine Sequenzanomalien im p53-Gen nachgewiesen werden	
p53 (Exon5)-Mutation	NEGATIV	
p53 (Exon6)-Mutation	NEGATIV	
p53 (Exon7)-Mutationen	NEGATIV	
p53 (Exon8)-Mutationen	NEGATIV	
erb-B2 nach Tumorzellisolierung	POSITIV Es wurde eine Amplifikation des erb-B2-Gens nachgewiesen	
c-myc nach Tumorzellisolierung	POSITIV Es wurde eine Amplifikation des c-myc-Gens nachgewiesen	
CK20-mRNA	POSITIV	
CEA-mRNA	POSITIV	NEGATIV
MUC1-mRNA	0.95	Es wird die Relation der 336BP-Splicevariante (tumor-spez.) zur 309BP-Splice-variante (natürlich) angegeben. bis 0.2 ist normal bis 0,7 schwache Expression >0,7 starke Expression
MUC1-mRNA Fraktion C	1.40	
bFGF-mRNA	NEGATIV	
bFGF-R-mRNA	POSITIV	
VEGF-mRNA	POSITIV	
VEGF-R1-mRNA	POSITIV	
VEGF-P2-mRNA	NEGATIV	
TIMP3-mRNA	NEGATIV	
HMP2-mRNA	NEGATIV	
Progesteron-R-mRNA	POSITIV	
Maspin-mRNA	POSITIV	
Perforin nach Tumorzellisolierung	NEGATIV	

## e) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Zellen nachweisen, die vom Karzinomtyp sein können. Krebszellenspezifisch konnten Zellen nachgewiesen werden, welche die krebsspezifische Splice-Variante des Mucin1-Gens verstärkt transkribierten. Auch CEA- und CK20-mRNA wurde von diesen Zellen exprimiert. Da diese Expressionscharakteristika beim Mammakarzinom angetroffen werden, stammten die Zellen höchstwahrscheinlich aus der Mamma, was durch die Expression von Maspin bestätigt wurde.

Die Tumorzellen ließen sich in der Fraktion C (MUC1) ohne lymphozytäre Verunreinigung (Perforin-negativ) anreichern. Die nachgewiesenen Zellen zeigten auch bereits Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit, da sie den b1G1<sup>+</sup>- und VEGF<sup>+</sup>-Rezeptor sowie VEGF<sup>+</sup> exprimierten, allesamt Prärequisits der Neoangiogenese. Die im Blut vagabundierenden Zellen exprimierten den Progesteron-Rezeptor.

Die c-myc- und erb-B2-Amplifikation sprachen darüber hinaus für eine schlechte Prognose. Qualitativ handelte es sich um einen typischen Hochrisiko-Verlauf mit extremer Wachstumsintensität, da diese Gene für Wachstums-signale im Krebsgewebe kodieren.

## f) Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Insgesamt spricht der Befund für ein streuendes Karzinom mit schlechter Prognose, welches der Mastopathie zugrunde lag.

## Beispiel 2 (Identifikation der Streuquelle)

## a) Klinische Ausgangssituation

Bei dem zu untersuchenden Patienten bestand der Verdacht auf Colon- oder Prostatakarzinom. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

## b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Stammt diese Zellen aus einem Prostata- oder einem Colonkarzinom?

## c) Untersuchungen

Zur krebsspezifischen Charakterisierung wurden isolierte Krebszellen auf k-ras-Mutationen untersucht. Zum Nachweis von Epithelzellen im Blut wurde der Gehalt an CK20-mRNA molekularbiologisch mit einer Sensitivität von mehr als 1 Zelle auf  $10^6$  Leukozyten organspezifisch (Ovar, Colon > Mamma) bestimmt. Außerdem wurde die Blutprobe auf CEA-mRNA untersucht. Dieser Nachweis von Zellen, die das onkogene Antigen CEA bilden, wurde mit einer Sensitivität von einer Krebszelle auf  $10^6$  Leukozyten geführt. Ferner wurde eine Bestimmung der MUC1-mRNA vorgenommen, um die karzinomspezifische Mucin-Transkription zu beurteilen.

Zur krebsassoziierten Charakterisierung untersuchte man die Blutprobe zunächst auf Angiogenesefaktoren, indem man den Gehalt an b1G1<sup>+</sup>-mRNA und b1G1<sup>+</sup>-R-mRNA sowie VEGF<sup>+</sup>-mRNA und VEGF<sup>+</sup>-R-mRNA's bestimmte. Zur Lokalisation der Streuquelle wurden die PSM- und Gastrin-mRNA als organspezifischer Nachweis für Prostata- bzw. Colonkarzinome analysiert. Weiterhin wurde die mRNA des epithelialen Glykoproteins (EGP) und der GAPDH gemessen.

Diese Untersuchungen wurden an Zellfraktionen des Buffy-Coats vorgenommen. Zunächst wurde die Fraktion A gewonnen, die überwiegend aus mononukleären Zellen (MNC's) und Epithelzellen, (EC's) bestand. Aus dieser Fraktion A wurden dann die Fraktionen B (MNC's) und C (EC's) gewonnen.

# DE 197 36 691 A 1

## d) Resultate

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
K-ras nach Tumorzellisolierung	POSITIV Es fand sich eine proteinrelevante Mutation im Exon 1	
K-ras(Exon1)-Mutation	POSITIV	
K-ras(Exon1)-Mutation	NEGATIV	
CK20-mRNA	POSITIV	
CEA-mRNA	NEGATIV	NEGATIV
MUC1-mRNA	> 1,00 Es fand sich nur die tumorspezifische Splicevariante	Es wird die Relation der 336BP-Splicevariante (tumor-spez.) zur 309BP-Splicevariante (natürlich) angegeben. bis 0,2 ist normal bis 0,7 schwache Expression >0,7 starke Expression
Gastrin-mRNA	POSITIV	
PSM-mRNA	NEGATIV	
bFGF-mRNA	NEGATIV	
bFGF-R-mRNA	POSITIV	
VEGF-mRNA	NEGATIV	
VEGF-R1-mRNA	NEGATIV	
VEGF-R2-mRNA	NEGATIV	
EGP-mRNA	255370	entspricht 100%
CAPDH-mRNA	125836424	entspricht 100%
EGP-mRNA Fraktion C	1773	entspricht 0,7% der Fraktion A
CAPDH-mRNA Fraktion C	625	entspricht 0,005% der Fraktion A

## e) Bewertung

Es konnten hämatogen streuende Zellen nachgewiesen werden, die ausschließlich die tumorspezifische Splice-Variante des MUC1-Gens als auch CK20 transkribierten und daher dem Karzinomtyp zuzuordnen waren. Sie ließen sich in der Fraktion C anreichern. Die hämatogen streuenden Zellen stammten mit Sicherheit aus dem Colon, da Gastrin-mRNA im Gegensatz zur Prostata-spezifischen PSM-mRNA nachgewiesen werden konnte.

In der Epithelzellfraktion C wurde auch das punktmutierte Onkogen k-ras gefunden, wie es für Colonkarzinome typisch ist. Die nachgewiesenen Zellen zeigten ebenfalls bereits Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit, da sie den bFGF-Rezeptor, ein Prärequisit der Neoangiogenese, exprimierten.

## f) Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Insgesamt sprach der Befund für ein streuendes Karzinom, welches sicher colorectal zu suchen war. Eine Therapie mit

## DE 197 36 691 A 1

Panorex schien indiziert, da die Zellen das therapeutische Zielgen VEGF exprimierten.

### Beispiel 3 (Prognose)

#### a) Klinische Ausgangssituation

5

Bei der zu untersuchenden Patientin bestand ein malignes Melanom im postoperativen Zustand (Clark II-III). Es wurde eine Blutprobe entnommen.

#### b) Fragestellung

10

Gibt es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Konnten weitere prognostische Aussagen zum Tumor gemacht werden?

#### c) Untersuchungen

15

Zur krebspezifischen Charakterisierung wurden isolierte Krebszellen auf p53-Mutationen untersucht. Zum Nachweis hämatogen streuender Melanozyten wurde in der entnommenen Blutprobe der Gehalt an Tyrosinase-mRNA, MAC13-mRNA und Mucin18-mRNA analysiert.

Zur krebsassoziierten Charakterisierung untersuchte man die Blutprobe zunächst auf Angiogenesefaktoren, indem man den Gehalt an bFGF-mRNA und bFGF-R-mRNA sowie VEGF-mRNA und VEGF-R-mRNA's bestimmte. Die Metastasierungs-fähigkeit wurde ferner charakterisiert, indem man die Genexpression einer Proteinase (MMP2) analysierte. Zur weiteren risikoprognostischen Abschätzung wurden die isolierten Tumorzellen auf FAS-Ligand- und FAS-Rezeptor-mRNA untersucht.

20

30

35

40

45

50

55

60

65



# DE 197 36 691 A 1

## d) Resultate

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
p53-Mutation in Tumorzellen	POSITIV	
p53 (Exon5)-Mutation	POSITIV Es liegt eine proteinrelevante Mutation vor	
p53 (Exon6)-Mutation	NEGATIV	
p53 (Exon7)-Mutationen	NEGATIV	
p53 (Exon8)-Mutationen	NEGATIV	
Tyrosinase-mRNA	POSITIV	
MAGE3-mRNA	POSITIV	
Muc18-mRNA	POSITIV	
bFGF-mRNA	NEGATIV	
bFGF-R-mRNA	POSITIV	
VEGF-mRNA	POSITIV	
VEGF-R1-mRNA	POSITIV	
VEGF-R2-mRNA	NEGATIV	
MMP2-mRNA	POSITIV	
FAS-mRNA in Fraktion C	POSITIV	
FAS-Rezeptor-mRNA in Fraktion C	NEGATIV	
Perforin nach Tumorzellisolierung	NEGATIV	

## e) Bewertung

Die Resultate sprachen für ein progressives malignes Melanom mit hämatogen streuenden Zellen, die metastasierungsfähig waren. Für die Metastasierungsfähigkeit der im Blut zirkulierenden Zellen sprach die Expression der Angiogenesefaktoren bFGF-Rezeptor, VEGF-Rezeptor 1 und VEGF ebenso wie die Fähigkeit der zirkulierenden Zellen zur Matrixdegradation (MMP2-mRNA nachgewiesen).

In der Fraktion C fand sich eine proteinrelevante Mutation des Onkogens p53 in Exon 5. Die Zellen exprimierten nur FAS-Ligand, nicht aber FAS-Rezeptor; sie waren möglicherweise einer zellvermittelten Cytotoxizität (Apoptose) nicht zugänglich. Eine lymphozytäre Verunreinigung der Fraktion C wurde ausgeschlossen, da sich Perforin nicht nachweisen ließ.

### Beispiel 4 (Therapierelevanz)

#### a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin wurde ein Mammakarzinom diagnostiziert (pT1b N1 M0). Es wurde eine Blutprobe entnommen.

# DE 197 36 691 A 1

## b) Fragestellung

Gibt es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden könnten? Bestand eine Chemoresistenz?

## c) Untersuchungen

Zur krebsspezifischen Charakterisierung wurden isolierte Krebszellen auf p53-Mutationen untersucht. Zum Nachweis von Epithelzellen im Blut wurde der Gehalt an CK20-mRNA molekularbiologisch mit einer Sensitivität von mehr als 1 Zelle auf  $10^6$  Leukozyten organspezifisch (Ovar, Colon > Mamma) bestimmt. Außerdem wurde die Blutprobe auf CEA-mRNA untersucht. Dieser Nachweis von Zellen, die das onkogene Adhären CEA bilden, wurde mit einer Sensitivität von einer Krebszelle auf  $10^6$  Leukozyten geführt. Ferner wurde eine Bestimmung der MUC1-mRNA vorgenommen, um die karzinomspezifische Mucin-Transkription zu beurteilen.

Zur krebsassoziierten Charakterisierung untersuchte man die Blutprobe zunächst auf Angiogenesefaktoren, indem man den Gehalt an bFGF-mRNA und bFGF-R-mRNA sowie VEGF-mRNA und VEGF-R-mRNA's bestimmte. Weiterhin wurde die Probe auf Maspin-mRNA untersucht.

Zur Bewertung einer möglicherweise bestehenden Chemoresistenz wurde die Blutprobe auf MDR1-DNA, Topoisomerase II-mRNA, MDR-mRNA, MRP-mRNA und GST-pi-mRNA untersucht.

Diese Untersuchungen wurden an Zellfraktionen des Buffy-Coats vorgenommen. Zunächst wurde die Fraktion A gewonnen, die überwiegend aus mononukleären Zellen (MNC's) und Epithelzellen, (EC's) bestand. Aus dieser Fraktion A wurden dann die Fraktionen B (MNC's) und C (EC's) gewonnen.

# DE 197 36 691 A 1

## d) Resultate

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
p53-Mutation in Tumorzellen	POSITIV	
p53(Exon5)-Mutation	NEGATIV	
p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV	
p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV	
p53(Exon8)-Mutationen	POSITIV Es handelt sich um eine proteinrelevante Mutation	
CK20-mRNA	POSITIV	
CEA-mRNA	POSITIV	NEGATIV
MUC1-mRNA	0.90	Es wird die Relation der 336BP-Splicevariante (tumorspez.) zur 309BP-Splicevariante (natürlich) angegeben. bis 0.2 ist normal bis 0,7 schwache Expression >0,7 starke Expression
MUC1-mRNA Fraktion C	1.40	
bFGF-mRNA	NEGATIV	
bFGF-R-mRNA	POSITIV	
VEGF-mRNA	POSITIV	
VEGF-R1-mRNA	POSITIV	
VEGF-R2-mRNA	NEGATIV	
Maspin-mRNA	POSITIV	
MDR1-Efflux-Doxorubicin-Test	55 %	40 - 65 %
MDR1-Pumpe-gp170	61 %	40 - 65 %
MDR1 (menschliches Genom)	NEGATIV	
MDR-mRNA Fraktion C	NEGATIV	
MRP-mRNA Fraktion C	NEGATIV	
GST-pi-mRNA Fraktion C	NEGATIV	
Topoisomerase-II-mRNA Fraktion C	POSITIV	

## DE 197 36 691 A 1

### e) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Zellen nachweisen, die vom Karzinomtyp sein konnten. Krebszellspezifisch konnten Zellen nachgewiesen werden, welche die krebsspezifische Splice-Variante des Mucin1-Gens verstärkt transkribierten. Auch CEA- und CK20-mRNA wurde von diesen Zellen exprimiert. Da diese Expressionscharakteristika beim Mammakarzinom angetroffen werden, stammten die Zellen höchstwahrscheinlich aus der Mammaria, was durch die Expression von Maspin bestätigt wurde.

Die nachgewiesenen Zellen zeigten auch bereits Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit, da sie den bFGF- und VEGF-Rezeptor sowie VEGF exprimierten, allesamt Prärequisite der Neoangiogenese. Außerdem ließ sich in der Tumorzellfraktion eine p53-Mutation in Exon 8 nachweisen. Dies ist ebenfalls ein für das Mammakarzinom typischer Befund.

### f) Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Insgesamt sprach der Befund für ein metastasierungsfähiges Karzinom. Bei der Patientin bestand kein Hinweis auf eine Chemoresistenz. Aufgrund der nachgewiesenen Topoisomerase-Expression als Zielgen schien eine Antrazyklintherapie indiziert zu sein.

### Beispiel 5 (vor Chemotherapie)

#### a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin wurde ein Mammakarzinom diagnostiziert. Die Patientin stand nicht unter Chemotherapie. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

#### b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Bestand eine Chemoresistenz?

#### c) Untersuchungen

Zur krebsspezifischen Charakterisierung wurden isolierte Krebszellen auf p53-Mutationen und Amplifikation von erb-B2 und c-myc untersucht. Zum Nachweis von Epithelzellen im Blut wurde der Gehalt an CK20-mRNA molekularbiologisch mit einer Sensitivität von mehr als 1 Zelle auf  $10^6$  Leukozyten organspezifisch (Ovar, Colon > Mammaria) bestimmt. Außerdem wurde die Blutprobe auf CEA-mRNA untersucht. Dieser Nachweis von Zellen, die das onkogene Adhärenz CEA bilden, wurde mit einer Sensitivität von einer Krebszelle auf  $10^6$  Leukozyten geführt. Ferner wurde eine Bestimmung der MUC1-mRNA vorgenommen, um die karzinomspezifische Mucin-Transkription zu beurteilen.

Zur krebsassoziierten Charakterisierung untersuchte man die Blutprobe zunächst auf Angiogenesefaktoren, indem man den Gehalt an bFGF-mRNA und bFGF-R-mRNA sowie VEGF-mRNA und VEGF-R-mRNA's bestimmte. Zur Bewertung einer möglicherweise bestehenden Chemoresistenz wurde die Blutprobe auf MDR1-DNA und Topoisomerase-mRNA untersucht. Die Expression der MDR1-Pumpe-gp170 wurde bestimmt.

Diese Untersuchungen wurden an Zellfraktionen des Buffy-Coats vorgenommen. Zunächst wurde die Fraktion A gewonnen, die überwiegend aus mononukleären Zellen (MNC's) und Epithelzellen, (EC's) bestand. Aus dieser Fraktion A wurden dann die Fraktionen B (MNC's) und C (EC's) gewonnen. Eine Anreicherung wurde durch die Expressionsbeziehung der Gene GAPDH und EGFP verfolgt.

# DE 197 36 691 A 1

## d) Resultate

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
p53-Mutation in Tumorzellen	Es konnten keine Sequenzanomalien im p53-Gen nachgewiesen werden	
p53(Exon5)-Mutation	NEGATIV	
p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV	
p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV	
p53(Exon8)-Mutationen	NEGATIV	
erb-B2 nach Tumorzellisolierung	NEGATIV Es konnte keine Amplifikation des erb-B2-Gens nachgewiesen werden	
c-myc nach Tumorzellisolierung	NEGATIV Es konnte keine Amplifikation des c-myc-Gens nachgewiesen werden	
CK20-mRNA	POSITIV	
CEA-mRNA	POSITIV	NEGATIV
MUC1-mRNA	0.55	Es wird die Relation der 336BP-Splicevariante (tumor-spez.) zur 309BP-Splicevariante (natürlich) angegeben. bis 0.2 ist normal bis 0,7 schwache Expression >0,7 starke Expression
bFGF-mRNA	NEGATIV	
bFGF-R-mRNA	NEGATIV	
VEGF-mRNA	NEGATIV	
VEGF-R1-mRNA	NEGATIV	
VEGF-R2-mRNA	NEGATIV	
MDR1-Pumpe-gp170	18 % <sup>1)</sup>	40 - 65 %

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
MDR1 (menschliches Genom)	NEGATIV Es konnten keine Amplifikationen nachgewiesen werden	
MDR1-mRNA	POSITIV	
GST-pI-mRNA	POSITIV	
Topoisomerase-II-mRNA	POSITIV	
MRF-mRNA	POSITIV	
EGP-mRNA	30743	entspricht 100 %
GAPDH-mRNA	1765600	entspricht 100 %
EGP-mRNA Fraktion C	1	
GAPDH-mRNA Fraktion C	0	
MUC1-mRNA Fraktion C	> 1,00	
bFGF-mRNA Fraktion C	0,00	

1) Unspezifische Antikörper-Bindungskapazität (ABC): 953  
Spezifische ABC: 2935

#### e) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Zellen vom Karzinomtyp nachweisen, welche die krebsspezifische Splice-Variante des MUC1-Gens transkribierten. Auch die Expression von CEA und CK20 konnte nachgewiesen werden. Diese Expressionscharakteristika sprachen für ein Mammakarzinom. Da die Analyse der obigen Angiogenesefaktoren negativ ausfiel, konnte davon ausgegangen werden, daß die zirkulierenden Krebszellen nur ein geringes Metastasierungspotential zeigten. Bei der Patientin bestand kein Hinweis auf eine Chemoresistenz.

#### f) Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Insgesamt sprach der Befund für ein streuendes Mammakarzinom ohne Anzeichen einer Chemoresistenz.

#### Beispiel 6 (nach Chemotherapie)

##### a) Klinische Ausgangssituation

Bei der Patientin handelte es sich um dieselbe, die im Beispiel 5 beschrieben wurde. Aufgrund des gemäß Beispiel 5 gestellten Befundes wurde die Patientin mit einer adjuvanten Chemotherapie und mit Tamoxifen behandelt. Nach Abschluß der Chemotherapie wurde der Patientin erneut Blut entnommen.

##### b) Fragestellung

Gibt es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten?

##### c) Untersuchungen

Zur krebspezifischen Charakterisierung wurden isolierte Krebszellen auf p53-Mutationen und Amplifikation von erb-B2 und c-myc untersucht. Zum Nachweis von Epithelzellen im Blut wurde der Gehalt an CK20-mRNA molekularbiologisch mit einer Sensitivität von mehr als 1 Zelle auf  $10^6$  Leukozyten organspezifisch (Ovar, Colon > Mamma) bestimmt.



# DE 197 36 691 A 1

Außerdem wurde die Blutprobe auf CEA-mRNA untersucht. Dieser Nachweis von Zellen, die das onkogene Adhären CEA bilden, wurde mit einer Sensitivität von einer Krebszelle auf 10<sup>6</sup> Leukozyten geführt. Ferner wurde eine Bestimmung der MUC1-mRNA vorgenommen, um die karzinomspezifische Mucin-Transkription zu beurteilen.

Zur krebsassoziierten Charakterisierung untersuchte man die Blutprobe zunächst auf Angiogenesefaktoren, indem man den Gehalt an bFGF-mRNA und bFGF-R-mRNA sowie VEGF-mRNA und VEGF-R-mRNA's bestimmte. Die Metastasierungsfähigkeit wurde ferner charakterisiert, indem man die Genexpression einer Proteinase (MMP2) und eines physiologischen Gegenspielers dieser Proteinase (TIMP3) analysierte. Der Nachweis von Steroidrezeptor exprimierenden, zirkulierenden Zellen wurde über die Progesteron-Rezeptor-Transkription geführt.

Diese Untersuchungen wurden an Zellfraktionen des Buffy-Coats vorgenommen. Zunächst wurde die Fraktion A gewonnen, die überwiegend aus mononukleären Zellen (MNC's) und Epithelzellen, (EC's) bestand. Aus dieser Fraktion A wurden dann die Fraktionen B (MNC's) und C (EC's) gewonnen. Eine Anreicherung wurde durch die Expressionsbeziehung der Gene GAPDH und IgG verfolgt.

Außerdem wurden die prognostischen Onkoproteine anti-p53, pan p53 und c-erb-B2 untersucht.

## d) Resultate

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
anti-p53	niedrig	NEGATIV
Pan p53	243 pg/ml	normal bis 646 grenzwertig bis 786 pathologisch ab 787
c-erb-B2	2610 HNU/ml	normal bis 3385 grenzwertig 3386 - 3845 pathologisch >3845
p53-Mutation in Tumorzellen	Es konnten keine Sequenzanomalien im p53-Gen nachgewiesen werden	
p53(Exon5)-Mutation	NEGATIV	
p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV	
p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV	
p53(Exon8)-Mutationen	NEGATIV	
erb-B2 nach Tumorzellisolierung	NEGATIV Es konnte keine Amplifikation des erb-B2-Gens nachgewiesen werden	
c-myc nach Tumorzellisolierung	NEGATIV Es konnte keine Amplifikation des c-myc-Gens nachgewiesen werden	
CK20-mRNA	NEGATIV	
CEA-mRNA	NEGATIV	NEGATIV
MUC1-mRNA	0.60	Es wird die Relation der 336BP-Splicevariante (tumorspez.) zur 309BP-Splicevariante (natürlich) angegeben. bis 0.2 ist normal bis 0,7 schwache Expression >0,7 starke Expression
bFGF-mRNA	NEGATIV	

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
bFGF-R-mRNA	POSITIV	
VEGF-mRNA	schwach positiv	
VEGF-R1-mRNA	POSITIV	
VEGF-R2-mRNA	NEGATIV	
TIMP3-mRNA	NEGATIV	
MMP2-mRNA	NEGATIV	
Progesteron-R-mRNA	POSITIV	
EGP-mRNA	232255	entspricht 100 %
GAPDH-mRNA	463040096	entspricht 100 %
EGP-mRNA Fraktion C	0	
GAPDH-mRNA Fraktion C	203	entspricht 0,00004 % von Fraktion A
MUC1-mRNA Fraktion C	0.00	

## e) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Zellen nachweisen, die vom Karzinomtyp sein konnten. Krebszellspezifisch konnten Zellen nachgewiesen werden, welche die krebspezifische Splice-Variante des Mucin1-Gens verstärkt transkribierten. Die nachgewiesenen Zellen zeigten erste Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit; sie exprimierten bFGF-R-, VEGF- und VEGF-R1-mRNA; MMP-2 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die im Blut vagabundierenden Zellen waren Progesteron-Rezeptor positiv. Unter den prognostischen Onkoproteinen war anti-p53 nachweisbar; dieses durch p53-Mutationen reaktive Protein deutete auf eine reduzierte Prognose hin.

## f) Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Insgesamt sprach der Befund für ein noch struendes Karzinom. Im Vergleich zum Vorbefund (vor der Chemotherapie) lag jedoch ein deutlich verändertes Bild vor. So war insbesondere MUC1 in der Fraktion C nicht mehr nachzuweisen und in der Fraktion A waren die Marker CK20 und CEA negativ. Dies sprach für einen deutlichen Therapieerfolg.

## Beispiel 7

## a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin bestand ein Verdacht auf Ovarkarzinom. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

## b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Bestand eine Chemoresistenz?

## c) Untersuchungen

Zur krebspezifischen Charakterisierung wurden isolierte Krebszellen auf p53-Mutationen und Amplifikation von erbB2 und c-myc untersucht. Zum Nachweis von Zirkulierenden im Blut wurde der Gehalt an CK20-mRNA molekularbiologisch mit einer Sensitivität von mehr als 1 Zelle auf  $10^6$  Leukozyten organspezifisch (Ovar, Colon > Mamma) bestimmt. Außerdem wurde die Blutprobe auf CEA-mRNA untersucht. Dieser Nachweis von Zellen, die das onkogene Adhärenz (CEA) bilden, wurde mit einer Sensitivität von einer Krebszelle auf  $10^6$  Leukozyten geführt. Ferner wurde eine Bestimmung der MUC1-mRNA vorgenommen, um die karzinomspezifische Mucin-Transkription zu beurteilen.

## DE 197 36 691 A 1

Zur krebsassoziierten Charakterisierung untersuchte man die Blutprobe zunächst auf Angiogenesefaktoren, indem man den Gehalt an bFGF-mRNA und bFGF-R-mRNA sowie VEGF-mRNA und VEGF-R-mRNA's bestimmte. Der Nachweis von Steroidhormonrezeptor exprimierenden, zirkulierenden Zellen wurde über die Progesteron-Rezeptor-Transkription geführt. Zur Bewertung einer möglicherweise bestehenden Chemoresistenz wurde die Blutprobe auf MDR1-DNA und Topoisomerase-mRNA untersucht. Die Expression der MDR1-gp170 Pumpe wurde bestimmt. Zusätzlich wurde der Doxorubicin-Efflux-Test durchgeführt.

Außerdem wurden die prognostischen Onkoproteine anti-p53, p21 p53 und c-erb-B2 untersucht.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# DE 197 36 691 A 1

## d) Resultate

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
anti-p53	NEGATIV	NEGATIV
Pan p53	440 pg/ml	normal bis 646 grenzwertig bis 786 pathologisch ab 787
c-erb-B2	2641 HNU/ml	normal bis 3385 grenzwertig 3386 - 3845 pathologisch >3845
p53-Mutation in Tumorzellen	Es konnten keine Sequenzanomalien im p53-Gen nachgewiesen werden	
p53 (Exon5)-Mutation	NEGATIV	
p53 (Exon6)-Mutation	NEGATIV	
p53 (Exon7)-Mutationen	NEGATIV	
p53 (Exon8)-Mutationen	NEGATIV	
erb-B2 nach Tumorzellisolierung	NEGATIV Es konnte keine Amplifikation des erb-B2-Gens nachgewiesen werden	
c-myc nach Tumorzellisolierung	NEGATIV Es konnte keine Amplifikation des c-myc-Gens nachgewiesen werden	
CK20-mRNA	NEGATIV	
CEA-mRNA	NEGATIV	NEGATIV
MUC1-mRNA	0.35	Es wird die Relation der 3368P-Splicevariante (tumor-spez.) zur 309BP-Splicevariante (natürlich) angegeben. bis 0.2 ist normal bis 0,7 schwache Expression >0,7 starke Expression
bFGF-mRNA	NEGATIV	
bPGF-R-mRNA	NEGATIV	
VEGF-mRNA	nicht bewertbar	
VEGF-R1-mRNA	NEGATIV	
VEGF-R2-mRNA	NEGATIV	

# DE 197 36 691 A 1

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
Progesteron-R-mRNA	schwach positiv	
MDR1-mRNA	POSITIV	
Tcpolimerase II-mRNA	NEGATIV	
MDR1-Efflux-Doxorubicin-Test <sup>1)</sup>	0 %	40 - 65 %
MDR1-Pumpe-gp170 <sup>2)</sup>	0 %	40 - 60 %
Glutation-S-Transferase-mRNA	POSITIV	
MRP-mRNA	POSITIV	

## 1) Bemerkung zum Parameter:

Im Gegensatz zu den Kontrollzellen konnten die Lymphozyten kein Doxorubicin akkumulieren. Damit war die Bestimmung des Effluxes nicht möglich.

## 2) Bemerkung zum Parameter:

Gegenüber den positiven Kontrollzellen ließ sich keine Expression der MDR1-Pumpe-gp170 auf den Lymphozyten nachweisen. Die quantitative Analyse ergab folgendes:  
Unspezifische Antikörper-Bindungskapazität (ABC): 1523  
Spezifische ABC: 4165

## e) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Krebszellen vom Karzinomtyp nachweisen, welche die krebs-spezifische Splice-Variante des MUC1-Gens verstärkt transkribierten.

Da die Analysen obiger Angiogenesefaktoren negativ ausfiel, konnten keine Zellen nachgewiesen werden, die zur Neovaskulogenese, dem funktionellen Zusammenspiel von Endothel- und Epithelzellen, befähigt waren. Die zirkulierenden Krebszellen zeigten daher keine Metastasierungsfähigkeit; von der Bildung aktiver Metastasen war nicht auszugehen. Die im Blut zirkulierenden Zellen exprimierten den Progesteron-Rezeptor. Bei der Patientin bestand kein Hinweis auf eine Chemosensitivität.

## f) Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Insgesamt sprach der Befund möglicherweise für ein Karzinom eines hormonsensitiven Organs.

## Beispiel 8

### a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin bestand aufgrund eines suspekten Mammabefundes (walnußgroßer Tumor bei unauffälliger Mammographie) ein Verdacht auf Mammakarzinom. In der Familie waren drei Fälle von Mamma-Neoplasien, davon zwei bei Patientinnen unter 50 Jahren und ein Fall einer Ovar-Neoplasie bekannt. Es bestand daher eine erbliche Tumor-Disposition. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

### b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten?

# DE 197 36 691 A 1

## c) Untersuchungen

Zur krebsspezifischen Charakterisierung wurden isolierte Krebszellen auf p53-Mutationen und Amplifikation von erb-B2 und c-myc untersucht. Zum Nachweis von Epithelzellen im Blut wurde der Gehalt an CK20-mRNA molekularbiologisch mit einer Sensitivität von mehr als 1 Zelle auf  $10^6$  Leukozyten organspezifisch (Ovar, Colon > Mamma) bestimmt. Außerdem wurde die Blutprobe auf CEA-mRNA untersucht. Dieser Nachweis von Zellen, die das onkogene Adhären CEA bilden, wurde mit einer Sensitivität von einer Krebszelle auf  $10^6$  Leukozyten geführt. Ferner wurde ein Bestimmung der MUC1-mRNA vorgenommen, um die karzinomspezifische Mucin-Transkription zu beurteilen.

Zur krebsassoziierten Charakterisierung untersuchte man die Blutprobe zunächst auf Angiogenesefaktoren, indem man den Gehalt an bFGF-mRNA und bFGF-R-mRNA sowie VEGF-mRNA und VEGF-R-mRNA's bestimmte. Die Metastasierungsfähigkeit wurde ferner charakterisiert, indem man die Genexpression einer Proteinase (MMP2) und eines physiologischen Gegenspielers dieser Proteinase (TIMP3) analysierte. Zum Nachweis von Steroidrezeptor exprimierenden, zirkulierenden Zellen wurde die Progesteron-Rezeptor-Transkription untersucht.

Außerdem wurden die prognostischen Onkoproteine anti-p53, pan p53 und c-erb-B2 untersucht. Diese Untersuchungen wurden an Zellfraktionen des Buffy-Coats vorgenommen. Zunächst wurde die Fraktion A gewonnen, die überwiegend aus mononukleären Zellen (MNC's) und Epithelzellen (EC's) bestand. Aus dieser Fraktion A wurden dann die Fraktionen B (MNC's) und C (EC's) gewonnen. Die Anreicherung von Epithelzellen wurde durch die Expressionsbeziehung der Gene GAPDH und HKI (Epitheliales Glykoprotein) verfolgt.

## d) Resultate

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
anti-p53	NEGATIV	NEGATIV
Pan p53	87 pg/ml	normal bis 646 grenzwertig bis 786 pathologisch ab 787
c-erb-B2	2540 HNU/ml	normal bis 3385 grenzwertig 3386 - 3845 pathologisch >3845
p53-Mutation in Tumorzellen	Es konnten keine Sequenzanomalien im p53-Gen nachgewiesen werden	
p53 (Exon5)-Mutation	NEGATIV	
p53 (Exon6)-Mutation	NEGATIV	
p53 (Exon7)-Mutationen	NEGATIV	
p53 (Exon8)-Mutationen	NEGATIV	
erb-B2 nach Tumorzellisolierung	NEGATIV Es konnte keine Amplifikation des erb-B2-Gens nachgewiesen werden	
c-myc nach Tumorzellisolierung	NEGATIV Es konnte keine Amplifikation des c-myc-Gens nachgewiesen werden	
CK20-mRNA Fraktion A	POSITIV	
CEA-mRNA Fraktion A	schwach positiv	NEGATIV



# DE 197 36 691 A 1

Untersuchung	Ergebnis	Referenzbereich
MUC1-mRNA Fraktion A	0,86	Es wird die Relation der 336BP-Splicevariante (tumor-spez.) zur 309BP-Splicevariante (natürlich) angegeben. bis 0,2 ist normal bis 0,7 schwache Expression >0,7 starke Expression
bFGF-mRNA Fraktion A	POSITIV 909 entspricht 100% (Fraktion A)	
bFGF-R-mRNA Fraktion A	NEGATIV	
VEGF-mRNA Fraktion A	POSITIV 72437 entspricht 100% (Fraktion A)	
VEGF-R1-mRNA Fraktion A	NEGATIV	
VEGF-R2-mRNA Fraktion A	NEGATIV	
TIMP3-mRNA Fraktion A	POSITIV	
MMP2-mRNA Fraktion A	schwach positiv	
Progesteron-R-mRNA	NEGATIV	
EGP-mRNA Fraktion A	104097	entspricht 100 %
GAPDH-mRNA Fraktion A	153350963	entspricht 100 %
CK20-mRNA Fraktion C	NEGATIV	
CEA-mRNA Fraktion C	NEGATIV	
MUC1-mRNA Fraktion C	0,00	
bFGF-mRNA Fraktion C	0,00	
VEGF-mRNA Fraktion C	1738	2,4 % bezogen auf Fraktion A
TIMP3-mRNA Fraktion C	NEGATIV	
MMP2-mRNA Fraktion C	NEGATIV	
EGP-mRNA Fraktion C	0	
GAPDH-mRNA Fraktion C	103644	entspricht 0,00708 % von Fraktion A

## e) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich geringe Mengen an hämatogen zirkulierenden Krebszellen vom Karzinomtyp nachweisen, welche die krebsspezifische Splice-Variante des MUC1-Gens verstärkt transkribierten. Auch die Expression von CK20 und CEA konnte nachgewiesen werden. Diese Expressionscharakteristika sprachen für ein Mammarkarzinom. Die zirkulierenden Krebszellen konnten allerdings nicht angereichert werden.

Da die Analysen obiger Angiogenesefaktoren teilweise positiv ausfiel (Expression von bFGF und VEGF), konnten

## DE 197 36 691 A 1

Zellen nachgewiesen werden, die zur Neoangiogenese, dem funktionellen Zusammenspiel von Endothel- und Epithelzellen, befähigt waren. Die zirkulierenden Krebszellen zeigten daher bereits Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit. Dafür sprach auch die Expression des MMP2-Gens. Die Bildung aktiver Metastasen war daher sehr wahrscheinlich. Der Progesteron-Rezeptor wurde von im Blut zirkulierenden Zellen nicht exprimiert.

### f) Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Insgesamt sprach der Befund für ein streuendes Karzinom. Die zirkulierenden Zellen stammten aus der Mamma.

### Glossar

#### AFP (Alpha-Fetoprotein)

AFP ist das Hauptplasmaprotein im Fetus. Es wird im Dottersack und von der fetalen Leber produziert. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu Albumin und der Tatsache, daß die Expression beider Proteine invers reguliert ist, wird angenommen, daß AFP das fetale Gegenstück zu Albumin ist. Tatsächlich entstanden beide Gene durch Genduplikation. Im Adulten ist die Expression von AFP sehr gering, es sei denn es liegt ein Tumor, wie ein Hepatom oder ein Teratom, vor.

#### Literatur:

Gibbs et al.: Structure, polymorphism, and novel repeated DNA elements revealed by a complete sequence of the human alphafetoprotein gene; *Biochemistry* 26: 1332-1343, 1987.

#### $\beta$ -Aktin

$\beta$ -Aktin gehört zu einer großen Gruppe von Genen, die für sogenannte Mikrofilamente kodieren. Diese spielen bei den verschiedensten Formen der Bewegung von Zellen und Organismen eine Hauptrolle.

#### Literatur:

Pollard, T.D. and Cooper, J.A.: Actin and Actin-Binding-Proteins. A Critical Evaluation of Mechanisms and Functions; *Ann. Rev. Biochem.* 55, 987 ff, 1986.

#### Albumin (AI.B)

Albumin ist das Hauptprotein des humanen Serums. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und dient daher zur Identifizierung von im Blut zirkulierenden Hepatomzellen.

#### Literatur:

Minghetti et al.: Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4; *J. Biol. Chem.* 261: 6747-6757, 1986.

#### AR (Androgen-Rezeptor)

Synonyme: Dihydrotestosteron-Rezeptor, Testosteron-Rezeptor, TRM

Der auf dem X-Chromosom lokalisierte Androgen-Rezeptor bindet Testosteron und Dihydrotestosteron. Der aktivierte Hormon/Rezeptor-Komplex wirkt als Transkriptionsfaktor während der normalen männlichen Fetalentwicklung. Erbliche Defekte des Androgen-Rezeptors führen zur Androgen-Resistenz und zum "testicular feminization syndrome". Prostatakarzinomzellen sind von der wachstums-stimulierenden Wirkung des AR abhängig. In Prostatakarzinomen konnten Mutationen im Androgen-Rezeptor nachgewiesen werden, die teilweise zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor führen.

#### Literatur:

Lubahn et al.: Sequence of the intron/exon junction of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (11): 9534-9538, 1989.

#### BA46 (Breast Epithelial Antigen 45)

Synonym: Human Milk Fat Globule Protein

Das Protein BA-46 mit einem Molekulargewicht von 46 000 ist eine Hauptkomponente der "Human Milk Fat Globule"-Membran. Dieses Glykoprotein wird von Mammarkarzinomen exprimiert und wurde erfolgreich als Ziel experimenteller Radioimmuntherapien benutzt. Es wird als Vorläufermolekül mit Signalsequenz synthetisiert und besitzt N-terminale Homologien zur EGF-ähnlichen, Calcium-bindenden Domäne der Gerinnungsfaktoren V und VIII.

#### Literatur:

Couto et al.: Cloning and sequence analysis of human breast epithelial antigen BA46 reveals an RGD cell adhesion sequence presented on an epidermal growth factor-like domain; *DNA Cell Biol.* 15: 281-286, 1996.

## DE 197 36 691 A 1

### Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)

Synonym: bFGF-2

- 5 bFGF ist ein potentes in-vitro Mitogen für vaskuläre Endothelzellen und stimuliert das Wachstum neuer Kapillaren (Angiogenese) in-vivo. bFGF ist außerdem an der Differenzierung und Proliferation unterschiedlicher Zellarten (z. B. Neurone), am Zellüberleben und an der Geweberegeneration beteiligt und auf Chromosom 4 lokalisiert. Bei vielen Tumoren wird bFGF überexprimiert und kann daher als ein Faktor für die Metastasierungsfähigkeit angesehen werden.
- Literatur:
- 10 Abraham et al.: Human basic fibroblast growth factor: Nucleotide sequence and genomic organization; EMBO J. 5: 2523-2528, 1986.

### BAX

- 15 Das bcl-2-Produkt heterodimerisiert in-vivo mit einem konservierten Homologen, dem BAX, wodurch der programmierte Zelltod beschleunigt wird.
- Literatur:
- Tsujiimoto Y. and Croce C.M.: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma; PNAS, 83 (14), 5214-5218, 1986.

### bcl-2

- In folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen wurde das bcl-2-Gen (B-cell-lymphoma) entdeckt. Es bildet ein Mitochondrien-assoziiertes Protein. Dieses Gen ist Teil einer Familie homologer Proteine, zu denen auch BAX und weitere BCLs gehören. BCL-2 kann die Apoptose blockieren.
- Literatur:
- 25 Tsujiimoto Y. and Croce C.M.: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved human follicular lymphoma; PNAS, 83 (14), 5214-5218, 1986.

### BRCA1

- 30 Das BRCA1-Gen wurde auf Chromosom 17q12-q21 kartiert und kodiert für ein 1863 Aminosäuren umfassendes Protein.
- Mutationen des BRCA1-Gens umfassen Deletionen und Insertionen ebenso wie Punktmutationen. Da die Mutationen zu einer eingeschränkten Funktion oder einem Funktionsverlust des Genprodukts führen, handelt es sich um ein Tumorsuppressor-Gen. Der Erbgang des BRCA1-Gens ist dominant. Bei 5-10% der Patientinnen mit Brustkrebs besteht eine erbliche Disposition, womit häufig auch eine Disposition für Ovarkarzinome verbunden ist. Mutationen des BRCA1-Gens stehen in Zusammenhang mit 45% der Mammarkarzinome mit erblicher Komponente. Mutationen im BRCA1-Gen betreffen auch Ovarkarzinome.
- Literatur:
- 40 Smith T.M., et al.: Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the BRCA1; Genome Res. 6, 1029-1049, 1996.

### BRCA2

- 45 Dieses Dispositions-Gen liegt auf Chromosom 13 und besteht aus 27 Exonen. Es handelt sich um ein Tumorsuppressor-Gen. Mutationen dieses Gens werden für einen hohen Anteil früh entstehender erblicher Brusttumoren verantwortlich gemacht.
- Literatur:
- 50 Lancaster J.M., et al.: BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. Nature Genet. 13, 238-240, 1996.

### Calcitonin

- Calcitonin (32 Aminosäuren) wird wie "Calcitonin gene-related peptide (CGRP; 37 Aminosäuren)" von einem Gen kodiert, dem calc-1. Als Folge alternativen Splicings entstehen 2 Peptide, wobei Calcitonin-mRNA das vornehmliche Produkt in parafollikulären thyroiden C-Zellen und die CGRP-mRNA das Hauptprodukt in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems ist. Calcitonin kann das Wachstum einer gastrischen Karzinomzelllinie hemmen und das Neurohormon CGRP kann als autokriner Wachstumsfaktor für murine Karzinomzelllinien fungieren sowie chemotaktisch auf eosinophile Granulozyten, T-Zellen und inhibierend auf die Milzzellenproliferation und IL-2-Synthese wirken.
- Literatur:
- 60 Adema and Baas: Deregulation of alternative processing of Calcitonin/CGRP-I pre-mRNA by a single point mutation; BBRC 178: 985-992, 1991.

### CC10 (Clara cell 10 kD Protein)

Synonym: Clara cell 10 kD Protein

CC10 wird nur in Alveolarepithelzellen Typ 2 und in Clara-Zellen des Lungenepithels exprimiert und ist an der Bil-

## DE 197 36 691 A 1

dung der "epithelial lining fluid" beteiligt.

Literatur:

Human CC10 gene expression in airway epithelium and subchromosomal locus suggest linkage to airway disease; *Am. J. Physiol.* 268: L565 (1995).

### CCK (Cholecystokinin)

Gene Map Locus: 3pter-p21

CCK ist ein Gehirn- und Darmhormon. Im Darm induziert es die Freisetzung pankreatischer Enzyme und die Kontraktion der Gallenblase. Das Gen beinhaltet 3 Exone und umspannt 7 kb. CCK wird zudem von einigen Sarkom-Neuroepitheliom-Zelllinien exprimiert.

Literatur:

Friedman, J.M. et al.: Expression of the cholecystokinin gene in pediatric tumors; *PNAS* 89: 5819-5823, 1992.

### CD44

Synonym: Hermes-Antigen, Pgp-1

Das CD44-Glykoprotein (MW: 80-95 kd) ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches als sogenannter Homing-Rezeptor auf Lymphozyten fungieren könnte. Das Molekül kann in ca. 20 verschiedenen Varianten exprimiert werden, welche durch unterschiedliches Splicing der RNA zustandekommen (10 unterschiedliche Exone v1-v10). Bestimmte Splicevarianten von CD44 spielen eine Rolle im Metastasierungsprozeß von Tumoren.

Literatur:

Matsumura, Y. and Tash, D.: Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation; *The Lancet* 340, 1053-1058, 1992.

### CEA (carcinoembryonales antigen)

Synonym: CD66c

CEA ist ein komplexes immunoreaktives Glykoprotein, das in gastrointestinalen und colorektalen Karzinomen, aber auch in verschiedenen soliden Tumoren, wie Mammakarzinomen, im fetalen Colon, nicht aber in normalen Lymphozyten exprimiert wird.

Wegen dieses Expressionsprofils dient der Nachweis CEA-positiver Zellen im Blut zur Diagnose zirkulierender Tumorzellen. Weiterhin sind CEA-Immunoassays wichtige Diagnoseverfahren bei der Beobachtung von Krebs-Patienten, besonders im Fall von Colonkarzinomen.

CEA ist Mitglied einer etwa 10 Gene umfassenden Gen-Familie, die NCA (Nonspecific crossreacting antigen) und "biliary glycoprotein" umfaßt und eine hohe Homologie zum neuronalen Zelladhäsionsmolekül (N-CAM) aufweist.

Literatur:

Zimmermann et al.: Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2960-2964, 1987.

### CK20 (Cytokeratin 20)

Die Cytokeratine bilden die intermediären Filamente des Cytoskeletts. Sie bilden eine Genfamilie mit etwa 20 Mitgliedern und werden hauptsächlich in epithelialen Zellen linien- und differenzierungsabhängig exprimiert. Maligne Zellen behalten in der Regel das Muster an Cytokeratinen und dieses kann demgemäß zur Rücklokalisierung der Tumorzellen auf ein Epithel benutzt werden. Da CK20 nicht von Zellen des peripheren Blutes exprimiert wird, sondern hauptsächlich von Zellen des Gastrointestinaltraktes, dient dieses Cytokeratin zum Nachweis im Blut zirkulierender Tumorzellen dieses Ursprungs.

Literatur:

Moll et al.: The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas; *Differentiation* 63: 75-93, 1993;

Burchill et al.: Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction; *British Journal of Cancer* 71: 278-281, 1995.

# DE 197 36 691 A 1

## Cyclin A

## Cyclin B(1)

## Cyclin D1

## Cyclin D2

## Cyclin D3

## Cyclin E

Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) sind essentiell für die Kontrolle des Zellzyklus eukaryotischer Zellen. Cycline und CDK's bilden zusammen aktive Komplexe, die in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus synthetisiert werden. Die Cycline D1, D2 und D3 werden in der G1-Phase synthetisiert, Cyclin E peakt in der Übergangsphase G1/S, Cyclin A steigt von der frühen S-Phase bis zum Ende der G2 Phase kontinuierlich an, Cyclin B1 wird in der Mitte der S-Phase synthetisiert, peakt zum Ende der G2 Phase und wird anschließend beim Übergang in die G0/G1 Phase abgebaut. Folglich korreliert die Messung der Cycline mit dem Zellzyklus.

### Literatur:

- Motozura T., et al.: Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene; *J. Biol. Chem.* 1992 Oct 5; 267 (28): 20412-5;  
 Lees E., et al.: Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner; *Genes-Dev.* 1992 Oct; 6 (10): 1874-85.

## Cyclin G

Cyclin G1 und G2 stellen zwei erst kürzlich identifizierte Cycline dar, welche im Zellzyklus eine Rolle spielen. Cyclin G besitzt zwei Bindungsstellen für p53, was vermuten läßt, daß Cyclin G besonders stark von der p53-Expression beeinflußt wird. Die Expression der Cyclin G-mRNA peakt in der frühen G1-Phase des Zellzyklus und nimmt dann kontinuierlich ab.

### Literatur:

- Herne M.C., et al.: Cyclin G1 and cyclin G2 comprise a new family of cyclins with contrasting tissue specific and cell cycle-regulated expressions; *J. Biol. Chem.* 1996 Mar 15; 271 (11): 6050-61.

## DCC

1988 wurde entdeckt, daß in colorectalen Tumoren häufig Sequenzen aus Chromosom 18 deletiert sind (DCC = Deleted in colorectal carcinomas). Es stellte sich heraus, daß der kritische Bereich zwischen 18q21.3 und dem Telomer liegt. Es konnte gezeigt werden, daß das DCC-Gen 29 Exone enthält. Während das DCC-Gen in den meisten normalen Geweben, einschließlich der Colon-Mucosa exprimiert wird, ist seine Expression in den meisten colorectalen Karzinomen stark reduziert. Das DCC-Gen kodiert ein Protein mit Sequenzähnlichkeiten zu Zelladhäsionsmolekülen. Der Verlust der 18q-Region ist verbunden mit einer schlechten Prognose. Der Status des DCC-Gens kann mittels Mikrosatelliten-Markern und PCR aus Formalin-fixiertem Material bestimmt werden.

### Literatur:

- Frank C.J., et al.: Evidence that loss of chromosome 18q is associated with tumor progression; *Cancer Res.* 57, (5), 824-827, 1997.

## DPC4

Die Bezeichnung bedeutet "deleted in pancreatic carcinoma". Etwa 90% der humanen Pankreaskarzinome zeigen einen Allelverlust auf Chromosom 18. Es handelt sich um ein Tumorsuppressor-Gen. Auch in Brust- und Ovarialkarzinomen wurden Änderungen des DPC4-Gens entdeckt.

### Literatur:

- Hahn S.A., et al.: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21; *Science* 271, 350-354, 1996.

## E-Cadherin

## Catenin ( $\alpha$ - und $\beta$ -)

Epitheliales E-Cadherin ist ein  $Ca^{2+}$ -abhängiges Zelladhäsionsmolekül, welches homophile Bindung zeigt. E-Cadherin ist, in Verbindung mit assoziierten Cateninen ( $\alpha$ -Catenin;  $\beta$ -Catenin) für die Organogenese und Histogenese von Epithelgewebe wichtig und spielt im Metastasierungsprozeß von Karzinomen eine zentrale Rolle.

### Literatur:

- Aberle H., et al.: Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function; *J. Cell. Biochem.* 1996 Jun 15; 61(4): 514-23.

## DE 197 36 691 A 1

### EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)

Synonyme: HMGF (human milk growth factor); PGF (prostatic growth factor); Urogastron

Das humane EGF wird als ein sehr langes Preproprotein synthetisiert und durch Proteolyse gespalten; dort wo der Precursor nicht gespalten wird, ist dieser in der Membran eingelagert und dient vermutlich als Rezeptor für einen noch unbekannten Liganden. Das EGF-Gen beinhaltet 24 Exone und befindet sich auf Chromosom 4. EGF zeigt hohe Homologie zum TGF- $\alpha$ , beide binden an den gleichen Rezeptor. EGF ist an der embryonalen Entwicklung beteiligt (ektodermale, mesodermale und endodermale Zellen) und kontrolliert/stimuliert die Proliferation von epidermalen und epithelialen Zellen in-vitro. EGF kann ebenfalls als angiogener und chemotaktischer Faktor wirken und scheint mit anderen Faktoren an der Wundheilung beteiligt zu sein.

#### Literatur:

Carpenter: EGF: new tricks for an old growth factor; Curr. Opin. Cell. Biol. 5: 261-264, 1993.

### EGF-R (EGF-Rezeptor)

Synonym: SA-7 (species antigen 7)

EGF-Rezeptoren werden von fast allen Geweben, ausgenommen Skelettmuskeln, parietalem Endoderm und hämatopoetischem Gewebe, exprimiert. Das Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert und kodiert ein transmembranes Glykoprotein; die extrazelluläre Domäne bindet neben EGF auch TGF- $\alpha$ , die intrazelluläre Domäne weist eine intrinsische tyrosinspezifische Proteinkinase-Aktivität auf. Die Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne ist zu 97% identisch mit dem Onkogen erb-B; letzteres führt zu malignen Transformationen. Ein anderes Onkogenprodukt namens c-ERB-B2 (neu) ist ebenfalls mit EGF-R nah verwandt. In einigen humanen Tumoren wird der EGF-R überexprimiert, was auch mit der Tumorigenität korreliert; eine schlechte Prognose ergibt sich aus der Coexpression des EGF-R mit entweder c-erb B2 oder TGF- $\alpha$ .

#### Literatur:

Ibelgaufs: Dictionary of cytokines, VCH, 1994.

### EGP (Epitheliales Glykoprotein)

Synonyme: CA733-2; 17-1A-Antigen; KSI/4

Das epitheliale Glykoprotein ist ein Zelloberflächenmolekül mit einem Molekulargewicht von 34 kD. Es wird von den meisten epithelialen Zelltypen exprimiert. Auch bei der Umwandlung in maligne/neoplastische Zellen bleibt die Expression des Proteins erhalten und kann somit als epithelspezifischer Marker zum Nachweis von Karzinomen dienen. Das Gen beinhaltet 9 Exone und 8 Introne. Die Funktion des Moleküls wird im Zusammenhang mit Adhäsionsmolekülen gesehen.

#### Literatur:

Simon, B. et al.: Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein; PNAS 87: 2755-2759, 1990;  
Szala, S. et al.: Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen CA733-2; PNAS 87: 3542-3546, 1990.

### Enteroglucagon

Synonyme: EGI, Glucagon 37

Gene Map Locus: 2q36 q37

Enteroglucagon ist ein Peptid mit 37 Aminosäuren, welches von den Zellen des Jejunum-Ileums produziert wird. Es entsteht durch spezifisches Processing aus Prepro-Glucagon. Das Glucagon-Gen codiert viele bioaktive Peptidhormone wie "Glucocorticoid-related-peptide" (GRPP), Glucagon, Glucocortin u. a. Enteroglucagon gehört zu einer Multigen-Familie, zu der auch Secretin, Vasoaktives Intestinales Peptid, Gastric Inhibitory Peptid und andere zählen.

#### Literatur:

Hell, G.T. et al.: Exon duplication and divergence in the human preproglucagon gene; Nature 304: 368-371, 1983.

### erb-B

Dieses Gen kodiert für den Rezeptor (EGF-R) des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF). Dieses Gen ist in etwa 50% der fortgeschrittenen humanen Glioblastomen amplifiziert und gehört zu einer Gen-Familie, der auch erb-B2 angehört. Erb-B liegt auf Chromosom 7.

#### Literatur:

Haley J., et al.: The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription; Oncogene Res. 1, 375-396, 1987.



# DE 197 36 691 A 1

## c-erb-B2

Synonyme: avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2; NGL (neuroblastoma or glioblastoma-derived); neu; tyrosine kinase-type cell surface receptor HER2; TKR1

5 erb B2, zunächst neu genannt, kodiert ein Tumorantigen, P185, welches serologisch mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) verwandt ist und als zur Tyrosinkinase-Genfamilie gehörender Wachstumsfaktor-Rezeptor funktioniert. Eine Überexpression konvertiert das Gen für einen normalen Wachstumsfaktor-Rezeptor, erb-B2, in ein Onkogen. Eine Amplifikation von erb-B2 wird in Adenokarzinomen, bei Brust- und Ovarialkrebs beobachtet. erb-B2  
10 ist außerdem bei der Entwicklung von akuter promyeloischer Leukämie (APL) involviert, da das Gen im Band q21.1 von Chromosom 17 lokalisiert ist, wo sich auch der Bruchpunkt der Translokation zwischen Chromosom 15 und 17 befindet (115: 17).

Literatur:

Slamon et al.: Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer; Science 244: 707-712,  
15 1989.

## FAP

Das Gen der familiären adenomatösen Polyposis coli, einer autosomal-dominanten Erkrankung, ist das *apc*. Das *apc*-  
20 Gen wurde auf dem Chromosom 5q21 identifiziert. Die Mutationen sind über einen weiten Bereich dieses Gens verteilt. Dies gilt sowohl für hereditäre als auch somatische Mutationen des *apc*-Gens. Es kommen auch Deletionen und Insertionen vor. Man beobachtet eine Häufung von Genänderungen im Bereich des Exon 15.

Literatur:

Groden J. et al.: Identification and characterisation of the familial adenomatous polyposis coli gene; Cell 66: 589-600, 1991.  
25

## FAS; FAS-L (CD95, CD95-L)

FAS gehört in die Gruppe der Apoptose-auslösenden Faktoren. FAS/APO-1 ist ein Rezeptor, der nach Bindung an Lymphozyten die Apoptose auslöst. FAS/APO-1 wird nicht nur von Lymphozyten, sondern auch von epithelialen Zellen, wie Enterozyten und Hepatozyten, gebildet. Die Auslösung der Apoptose erfolgt durch den zugehörigen Liganden (FAS-  
30 L). FAS/APO-1 ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie.

Literatur:

Alderson N.R.: FAS ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes; J. Exp. Med. 181, (1), 71-77, 1995;  
35 Itoh N.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen FAS can mediate apoptosis; Cell 66, (6), 233-243, 1991.

## FGF-Rezeptoren

40 Synonyme: fms-like tyrosine kinase-2; FLT2; FMS-like gene; FLG (bFGF-R1); K-SAM, bek (FGF-R2)

Die FGF-R1 und -R2 sind Tyrosinkinasen und gehören zu den FGF-Rezeptoren, die den sauren und basischen FGF mit hoher Affinität binden. Alternatives Spleißen dieser Rezeptoren kann zu veränderten Zell- und Gewebespezifitäten, aber auch zur Modifikation von Ligandbindungsaffinitäten und -spezifitäten führen. Unterschiedliche Expression und al-  
45 ternatives Spleißen können möglicherweise in der malignen Progression von Tumoren kritisch sein.

Literatur:

Yamaguchi et al.: Differential expression of two fibroblast growth receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 484-488, 1994.

50 c-fos

Das FOS-Genprodukt ist ein Transkriptionsfaktor. FOS ist eine Hauptkomponente im AP1-Transkriptionsfaktorkomplex zusammen mit JUN. Das c-fos- und c-jun-Genen kommt ein zentraler Stellenwert im Rahmen der Wachstumsregulation zu. Das Gen wurde auf Chromosom 14 kartiert.

55 Literatur:

Ekstrand A.J., et al.: Human c-fos proto-oncogene mapped to chromosome 14: possibilities for oncogene activation by chromosomal rearrangements in human neoplasia; Exp. Cell Res. 169: 262-266, 1987.

## GADD45

60 Gadd45 ist ein Wachstumsarrest- und ein durch DNA-Schäden induziertes Gen, welches durch das p53-Tumorsuppressor-Gen reguliert wird. GADD45 ist ein nukleäres Protein und interagiert mit dem DNA-Replikations- und Reparaturprotein PCNA und den CDK-Inhibitoren p21, WAF1/CIP1.

Literatur:

65 Constance, C.M. et al.: C/EBPalpha regulation of the growth-arrest-associated gene gadd45; Mol. Cell Biol. 1996 Jul; 16 (7): 3878-3883;

Crawford, D.R. et al.: Oxidant-inducible adapt 15 RNA is associated with growth arrest- and DNA damage-inducible

## DE 197 36 691 A 1

gald153 and galk45; Arch-Biochem-Biophys. 1996 May 15; 329 (2): 137-44.

### GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase)

GAPDH ist eine Hydrogenase, welche von allen eukaryotischen Zellen exprimiert wird. Sie stellt eine wichtige Komponente der Glykolyse dar. Da dieses Gen in allen Zellen exprimiert wird, korreliert die Messung mit der Zellzahl und dient zur quantitativen und qualitativen Bestätigung der cDNA.

#### Literatur:

Allen, R.W. et al.: Identification of the 37-kDa protein displaying a variable interaction with the erythroid cell membrane as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; J. Biol. Chem. 262 (2), 649-653, 1987.

### Gastrin (GAS)

#### Gene Map Locus: 17q21

Gastrin wird vornehmlich von mukosalen Zellen des Magens und den D-Zellen im Pankreas produziert. Es stimuliert die HCl-Produktion durch die Magenschleimhaut. HCl wiederum inhibiert die Synthese von Gastrin. Das nur 17 Aminosäuren umfassende Hormon hat ein Molekulargewicht von 2.117 kD. Es gibt zwei leicht unterschiedliche Formen, Gastrin I und II (Sulfatester-Gruppe an Tyrosin an Pos. 12). Literatur:

Boel, B. et al.: Molecular cloning of human gastrin cDNA: evidence for evolution of gastrin by gene duplication; PNAS 80: 2866-2869, 1983.

### GID-AIF (Glioma-Derived Angiogenesis Inhibitory Factor)

Das GID-AIF gehört ebenso wie Thrombospondin und Angiostatin zu endogenen Negativ-Regulatoren der Angiogenese, die mit neovaskularisierten Tumoren in Zusammenhang stehen. Das Umschalten auf den angiogenischen Phänotyp der Tumorgenese ist ein Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Regulatoren des Blutgefäßwachstums. Das Ausmaß, in dem die negativen Regulatoren während der Umschaltphase abbrechen, entscheidet darüber, ob ein Primärtumor langsam oder schnell wächst und ob Metastasen gebildet werden.

#### Literatur:

Folkman J.: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease; Nat. Med. 1 (1995) 27-31.

### GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide)

#### Synonym: Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide

#### Gene Map Locus: 17q21.3-q22

GIP ist ein 42 Aminosäuren umfassendes Hormon, welches die Insulin-Produktion in Gegenwart von Glucose induziert. GIP entsteht durch proteolytische Spaltung eines 153 Aminosäuren umfassenden Prepro-GIP. Produziert wird dieses Hormon vornehmlich von Zellen des oberen Dünndarms.

#### Literatur:

Inagaki, N. et al.: Gastric inhibitory polypeptide: structure and chromosomal localization of the human gene; Molec. Endocr. 3: 1014-1021, 1989.

### GST-pi (Glutathion-S-Transferase-pi)

GST-pi kodiert für ein detoxifizierendes Enzym und spielt daher bei der Entwicklung von chemoresistenten Tumoren eine Rolle. Nach Chemotherapie konnte eine Steigerung der Expression in Tumoren beobachtet werden, was mit einer ungünstigen Prognose und Chemoresistenz einhergeht.

#### Literatur:

Morrow et al.: Structure of the human genomic glutathione S-transferase-pi gene; Gene 75: 3-11, 1989.

### Granzym

Granzyme gehören zur Gruppe der Serinproteasen und bilden eine Familie von 10 Genen. Sie werden von T-Zellen und NK-Zellen produziert, wobei ihre Hauptfunktion in der Lyse von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen liegt. Dabei werden die Zielzellen durch eine apoptotische Fragmentierung der DNA zerstört; der Signalweg scheint aber nicht der gleiche zu sein, über den die FAS-F./FAS-R-induzierte Apoptose abläuft.

#### Literatur:

Kummer, J.A. et al.: Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection; Kidney Int. 47: 70-77 (1995).

### hCG (Humanes Chorionisches Gonadotropin)

hCG-Serumkonzentrationsbestimmungen werden vor allem im Rahmen der Schwangerschaftsdiagnostik eingesetzt. Die  $\beta$ -Untereinheit des hCG dient aber auch als Marker für Keimhauttumoren und Chorionkarzinome. Neuere Arbeiten:

## DE 197 36 691 A 1

nutzen die Detektion der hCG-mRNA mittels RT-PCR auch in der Diagnostik metastasierender Mammarkarzinome und maligner Melanome.

Literatur:

- 5 Doi F. et al: Detection of beta-human chorionic gonadotropin mRNA as a marker for cutaneous malignant melanoma; Int. J. Cancer- 65 (1996) 454-459.

### hIC-1 (hypermethylated in cancer)

- 10 Das hIC-1 gilt als mögliches Tumorsuppressor-Genprodukt auf Chromosom 17p13.3. Es gehört zu den Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren. hIC-1 wird in normalen Zellen stetig exprimiert; in Tumorzellen, in denen es hypermethyliert ist, erfolgt jedoch eine Unterexpression. Das hIC-1 weist einen Bindungsort für das p53 in seiner 5' Region auf, durch welches es auch transkriptional aktiviert wird.

Literatur:

- 15 Wales M. M., et al.: p53 activates expression of hIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3; Nat. Med. 1 (1995) 570-577.

### HSP70

- 20 HSP70 stellt ein sogenanntes molekulares Chaperone dar. Hitzeschockproteine im allgemeinen stellen sogenannte Stressproteine dar, die einzeln oder im Verbund mit anderen Hitzeschockproteinen (z. B. HSP40) auf die Physiologie der Zellen Einfluß nehmen. HSP70 steht im Verdacht, Zellen gegen einen Angriff von Effektorzellen des Immunsystems über "nitric oxide" resistent zu machen, könnte folglich ein möglicher "Escape-Mechanismus" von Tumorzellen sein.

Literatur:

- 25 Kaur J. and Rathn R.: Differential expression of 70-kDa heat shock-protein in human oral tumorigenesis; Int. J. Cancer. 1995 Dec 11; 63 (6): 774-9.

### hTG (humanes Thyroglobulin)

- 30 Dieses Schilddrüsenprotein kann das Ziel autoreaktiver Reaktionen des Immunsystems sein. Es weist einen hohen Glykosylierungsgrad auf, und einige Epitope werden von autoreaktiven T-Lymphozyten sowie von Autoantikörpern erkannt. Das hTG ist ein single-copy Gen, das wenigstens 42 Exone beinhaltet. Es wurden vier Transkripte identifiziert, welche die Folge alternativen Splicings sind.

Literatur:

- 35 Bertaux et al.: Identification of the exon structure and four alternative transcripts of the thyroglobulin-encoding gene; Gene 156: 297-301, 1995.

### ICAM (Interzelluläre Adhäsionsmoleküle)

Synonyme: ICAM-1 (CD54, ICAM1-1); ICAM-2 (CD102); ICAM-3

- 40 Die ICAM's-1, -2, und -3 sind Zelloberflächenmoleküle und dienen als Liganden der Leukozytenintegrine. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Bindung von Lymphozyten und anderen Leukozyten an bestimmte Zellen, wie z. B. an antigen-präsentierende Zellen und Endothelzellen. Die ICAM's sind Proteine der Immunglobulin-Superfamilie.

- 45 IGF (Insulin-like growth factor)

Synonyme: MSA (multiplication-stimulating activity); Somatomedin; NSIL-A (non-suppressible insulin-like activity); SF (sulfation factor), STFA, SGT (Skeletal growth factor), SMP

- 50 Zwei unterschiedliche IGF-Proteine, IGF-1 und IGF-2, besitzen homologe Strukturen zum humanen Pro-Insulin (50%) und zeigen ca. 60% Sequenzhomologien untereinander. Beide IGF's weisen untereinander keine immunologische Kreuzreaktivität auf und liegen auf verschiedenen Chromosomen (IGF-1, Chr. 12; IGF-2, Chr. 11). IGF's wirken als mitogene, autokrine und angiogene Faktoren.

Literatur:

- 55 Cohick and Clemmons: The insulin-like growth factors; Annual Review of Physiology 55: 131-153, 1993.

### IGF-BP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3)

Synonyme: IGBP; IBP, BP-53; growth hormone dependent binding protein; binding protein 29

- 60 IGF-BP3 ist das größte IGF-bindende Protein, das im Serum von Menschen und Tieren vorkommt. Es bindet IGF-1 und -2 mit ähnlicher Affinität und bildet einen Komplex aus drei Untereinheiten in humanem Serum: Einem nicht-IGF-bindenden Glykoprotein, IGF-1 oder IGF-2 und BP-3 selbst. Eine starke Erniedrigung von BP-3 im Serum wird bei Patienten mit Wachstumshormondefiziten beobachtet. Eine Akkumulation von IGF-BP3 scheint eine Feedback-Regulation des Zellwachstums zu induzieren; es fungiert als Wachstumsinhibitor.

Literatur:

- 65 Lamson: Insulin-like growth factor binding proteins: Structural and molecular relationships; Growth factors 5: 19-28, 1991.

# DE 197 36 691 A 1

## Integrine

Integrine sind heterodimere Zelloberflächenantigene, die an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen beteiligt sind. Sie sind wichtig für die Adhäsion zwischen Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen sowie bei der Wanderung von Lymphozyten und Leukozyten ins Gewebe.

### Literatur:

Vith International Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop and Conference, Kobe (Japan), November 1996.

## Interferon-gamma

Synonyme: Immune interferon; type 2 interferon; T interferon; antigen-induced interferon; mitogen induced interferon; ph2-labile interferon

Das IFN-gamma-kodierende Gen besteht aus 4 Exonen und wurde auf Chromosom 12 lokalisiert. IFN-gamma besitzt nur wenig Homologie zu IFN-alpha und -beta und bindet auch an einen eigenen Rezeptor. IFN-gamma wird von T- und NK-Zellen sowie von Monozyten produziert. Es wirkt wachstumshemmend und antiviral; zusätzlich nimmt es weitere Funktionen bei der Aufregulation von MHC-Klasse I und II-Molekülen und Tc-Rezeptoren, und bei der zellulären Cytotoxizität wahr, blockiert T-Helfer 2-Antworten und den Immunglobulin-Klassen-Switch zu IgH und IgG1 und induziert die Synthese von Interleukin 1 und 2 und Adhäsionsmolekülen. Es aktiviert auch Makrophagen.

### Literatur:

Gray et al.: Expression of human immune interferon cDNA in E.coli and monkey cells; Nature 295: 503-508, 1982; Ibelgaufis; Dictionary of cytokines. VCH 1994.

### Literatur:

Vith International Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshop and Conference, Kobe (Japan), November 1996.

## L32

L32 ist ein ribosomales Protein, welches an der RNA-Bindung beteiligt ist. Aufgrund der ubiquitären Expression eignet es sich als Zielgen für Quantifizierungen.

### Literatur:

Young, J.A. and Trowsdale, J.: A processed pseudogene in an intron of the IIIA-DP beta-1 chain gene is a member of the ribosomal protein L32 gene family; Nucleic Acids Res. 13 (24), 8883-8891, 1985.

## LTP

Synonyme: Protein-Tyrosinephosphatase; Alpha-Polypeptide; PTPRA; PTPA

Ltp kodiert für eine ubiquitär exprimierte Protein-Tyrosin-Kinase vom Rezeptor-Typ. Das Protein besitzt eine 121 Aminosäuren umfassende extrazelluläre Domäne, eine einzige transmembrane Region sowie zwei cytoplasmatische katalytische Domänen. Da Signaltransduktion und Zellproliferation auch durch Aktivitätsunterschiede zwischen Phosphatase und Kinasen reguliert werden, haben beide eine Bedeutung bei der Tumorentstehung.

### Literatur:

Jirik et al.: Cloning and chromosomal assignment of a widely expressed human receptor-like protein-tyrosin phosphatase; FEBS Lett. 273: 239-242, 1990.

## MAGE1 (Melanoma associated antigen-1)

Synonyme: MZ2-E

Das MAGE1-kodierende Gen gehört zu einer Genfamilie mit bisher 11 anderen Mitgliedern. Alle diese Gene sind auf dem langen Arm des X-Chromosoms lokalisiert und weisen untereinander eine hohe Homologie auf. Sie werden alle in 2 Exonen kodiert, wobei die gesamte kodierende Region im zweiten Exon liegt. Es wird spekuliert, daß die MAGE1-Gene bei X-gekoppelten erblichen Krankheiten eine Rolle spielen, wie der Dyskeratosis congenita.

Das MAGE1-Gen kodiert für ein Antigen auf der Oberfläche von Melanom-Zellen, das in-vitro von autologen cytolytischen T-Lymphozyten erkannt wird. Während MAGE1 auf der RNA-Ebene in vielen Tumoren auf hohem Level nachweisbar ist, findet sich die RNA nicht in normalen Geweben mit der Ausnahme von Hoden und Ovar. Dieses Genprodukt ist also hervorragend als Marker für zirkulierende Tumorzellen, insbesondere Melanom-Zellen, geeignet.

### Literatur:

De Plaen et al.: Structure, chromosomal localisation, and expression of 12 genes of the MAGE family; Immunogenetics 40: 360-369, 1994.

## MAGE3 (Melanoma associated antigen-3)

Das MAGE3-kodierende Gen wird in etwa 69% der Melanome transkribiert. Da es bisher nur in Tumorgewebe und bis auf Hoden in keinem Normalgewebe gefunden wurde, eignet sich dieses Gen als Marker für zirkulierende Melanom-Zellen.

len.

Literatur:

Gaugler et al.: Human Gene MAGI-3 codes for an Antigen recognized on melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes; *J. Exp. Med.* 179: 921-930, 1994.

5

#### Maspin

Maspin wurde in einem Ansatz zur Identifikation von möglichen Tumorsuppressor-Genen, die in Mammakarzinomzellen defekt sind, kloniert. Es ist ein Mitglied der Serpin-Familie von Protease-Inhibitoren. Entsprechend der postulierten tumorsuppressorischen Funktion ist in fortgeschrittenen Tumoren mit einer reduzierten Maspin-Funktion zu rechnen. Dabei scheint der Verlust eher über eine Verringerung der Expression, als durch Mutation erreicht zu werden. Durch Einführen des Maspin-Proteins in Mammakarzinom-Zelllinien wurde deren Fähigkeit, Tumoren in der Nacktmaus zu induzieren und in-vitro durch eine Basalmembran zu metastasieren, reduziert. Das Konzept einer tumorsuppressorischen Funktion von Maspin wurde damit gestützt.

15 Literatur:

Luppi et al.: Sensitive detection of circulating breast cancer cells by reverse-transcriptase polymerase chain reaction of maspin gene; *Annals of Oncol.* 7: 619-624, 1996.

#### mdm2

20

Das mdm2-Gen ist ein Ziel der transkriptionellen Aktivierung durch p53, da es in einem seiner Promotoren Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor p53 trägt, wodurch eine starke Induktion von mdm2 erreicht werden kann. Auf der anderen Seite ist MDM2 ein Gegenspieler von p53, da das mdm2-Genprodukt mit p53 stabile Komplexe bildet, und so die Funktion von p53 als Transkriptionsaktivator verhindert. Nach einer Aktivierung von p53 und der nachfolgenden Synthese von MDM2, wurde also MDM2 wieder zu einer Gegenregulation der p53-Aktivität führen (negativer feedback loop). Der onkogene Effekt einer gesteigerten MDM2-Aktivität würde sich also in einer Inaktivierung der durch p53 induzierten Wachstumsinhibition bemerkbar machen. In Übereinstimmung dazu findet man in humanen Tumoren eine Überexpression von MDM2.

25 Literatur:

Zaubermann et al.: A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene; *Nucleic Acids Res.* 23: 2584-2592, 1995.

#### $\beta$ 2-Mikroglobulin

35

$\beta$ 2 Mikroglobulin gehört zur polymorphen Klasse I MHC-Molekül und wird auf allen kernhaltigen Zellen der Vertebraten exprimiert. Es hat ein Molekulargewicht von 15 kDa und ist nicht-kovalent mit der schweren alpha-Kette des MHC-Moleküls assoziiert. Das Molekül gehört zur Ig-Superfamilie.

Literatur:

Williams, A.F. and Barclay, A.N.: The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition; *Annu. Rev. Immunol.* 6, 381; 1988.

40

#### MLH1

Synonyme: FCC2; COCA2; HNPCC (Hereditary Nonpolyposis colorectal cancer Type 2)

45

Mutationen in dem auf Chromosom 3p21.3 lokalisierten Gen mlh1 sind für eine erbliche Form des Colonkarzinoms (hereditary nonpolyposis colon cancer = HNPCC) verantwortlich. Das mlh1-Gen kodiert für ein DNA-Reparaturgen, das zum bakteriellen MutL-Gen homolog ist. Mutationen in diesem Gen sind für etwa 30% der HNPCC-Fälle verantwortlich, aber etwa 60% der Fälle werden durch Mutationen im MSI2-Gen auf Chromosom 2 verursacht. Es wurden zwei weitere humane Gene, die zu MutL homolog sind, isoliert: pms-1 und pms-2. Diese sind allerdings seltener als mlh2 und mlh1 an der Entstehung von Tumoren beteiligt.

50

Das humane mlh1-Gen besteht aus 19 Exonen und überspannt eine genomische Region von etwa 100 kb. Das Mutationsspektrum für mlh1 ist heterogen, es findet sich aber eine Häufung von Mutationen in den Exonen 15 und 16, die etwa 50% der unabhängigen Mutationen in mlh1 ausmachen.

55

Literatur:

Bellacosa et al.: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: review of clinical, molecular genetics and counseling aspects; *Am. J. Med. Genet.* 62: 353-364, 1996.

#### MMP (Metalloproteinase)

60

MMPs sind  $Zn^{2+}$ -bindende Endopeptidasen, die Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen. Sie sind an Gewebestrukturierungen, bei der Entwicklung, Entzündungen, Wundheilung, Angiogenese und der Tumordinvasion beteiligt. Es existieren mind. 11 MMPs, von denen 6 auf Chromosom 11 lokalisiert sind. Eine Überexpression von Metalloproteinasen zerstört die Balance zwischen Degradation und Aufbau extrazellulärer Matrices inklusive der Basalmembranen und fördert damit die Invasion und Metastase von Tumoren. Einige dieser Metalloproteinasen werden von Tumorzellen sowohl auf der Zelloberfläche als auch auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert.

65

Literatur:

Freije et al.: Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced bre-

## DE 197 36 691 A 1

ast carcinomas; J. Biol. Chem. 269: 16766-16773, 1994;

Sato et al.: A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells; Nature 370: 61-65, 1994.

### Motilin (MLN)

Gene Map Locus: 6p21.3

Motilin ist ein 22 Aminosäuren umfassendes Hormon, welches von Zellen des Dünndarms produziert wird. Es reguliert die gastrointestinalen Kontraktionen. Motilin entsteht durch proteolytische Spaltung eines 115 Aminosäuren umfassenden Vorläuferproteins. Auf DNA-Ebene liegt das Gen in Form von 5 Exonen vor, wobei das Signalpeptid und das 22 Aminosäuren umfassende Motilin-Peptid von den Exonen 2 und 3 codiert werden.

#### Literatur:

Daikh, D.I et al.: Structure and expression of the human motilin gene; DNA 8: 615-621; 1989.

### MRP1 (Multidrug Resistance-Associated Protein-1)

Das MRP1-Gen kodiert für eine in der Plasmamembran lokalisierte Chemotherapeutika-Emul-Pumpe mit Ähnlichkeiten zur "ATP-binding cassette"-Superfamilie von Transportsystemen, zu der auch MDR1 und der "cystic fibrosis transmembran conductance regulator" gehört. MRP1-mRNA konnte in Geweben, wie Lunge und Hoden, aber auch in mononukleären Zellen gefunden werden. In einer chemoresistenten Zelllinie des kleinzelligen Lungenkarzinoms konnte eine MDR1 Überexpression, die auf eine genomische Amplifikation des Gens zurückzuführen war, nachgewiesen werden.

#### Literatur:

Cole et al.: Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line; Science 258: 1650-1654, 1992.

### MSH2

Dieses Gen konnte dem Chromosom 2 zugeordnet werden. Das Gen besteht aus 16 Exonen. Es spielt bei Tumoren eine Rolle, die sich bei Patienten mit hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) entwickeln. Mutationen in nonpolyposis colon cancer verhalten sich wie Defekte in der DNA-Reparatur. MSH2-Mutationen fanden sich in 21% der betroffenen HNPCC-Familien.

#### Literatur:

Fishel R., et al.: Binding of mismatched microsatellite DNA sequences by the human MSH2 protein; Science 266: 1403-1405, 1994.

### MUC1 (Mucin-1)

Synonym: urinary

Das MUC1-Gen auf Chromosom 1 kodiert ein transmembranes Glykoprotein und gehört zu einer MUC-Familie. Diese Glykoproteine werden von sekretorischen epithelialen Zellen zum Schutz und als "Schmierstoff" gebildet, von Tumorzellen allerdings mehr zum Schutz gegenüber cytotoxischen Immunzellen und um die Metastasierung voranzutreiben. MUC1 wird von normalen Geweben und Zellen, aber auch von malignen Zellen und Geweben synthetisiert. Z.B. zeigen Brustkrebs-, Pankreaskrebs- und Adenokarzinomzellen eine Überexpression des MUC1-Proteins; außerdem wird bei einigen Krebsarten eine tumorspezifische Splicevariante neben der "normalen" Variante detektiert.

#### Literatur:

Weiss et al.: Preoperative diagnosis of thyroid papillary carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction of the MUC1 gene. Int. J. Cancer 66: 55-59, 1996.

### Muc18

Muc18 kodiert für ein 113 kD Zelloberflächen-Glykoprotein und ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie mit einer Homologie zu verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen. Die Expression ist beschränkt auf fortgeschrittene primäre und metastasierende Melanome, sowie auf Zelllinien der neuroektodermalen Linie. In etwa 80% der Melanome wird eine mRNA-Expression gefunden, wobei die Expression mit dem Metastasierungszustand der Zellen korreliert. Die Anwesenheit von Zellen im Blut, die diese mRNA exprimieren, ist also ein guter Hinweis auf zirkulierende Tumorzellen eines fortgeschrittenen oder metastasierenden Melanoms.

#### Literatur:

Lehmann et al.: MUC-18 a marker of tumor progression in human melanoma, shows a sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9891-9895, 1989.

### myc

Synonym: Proto-Onkogen homolog zum myelozytomatösen Virus

C-myc ist auf dem Chromosom 8 neben 8q24, dem Bruchpunkt in Burkitt Lymphom-Translokationen, lokalisiert. Die Amplifikationen von myc wird in fortgeschrittenen und in aggressiven, primären Tumoren gefunden.

#### Literatur:

## DE 197 36 691 A 1

Adams et al.: Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas; Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 1982-1985, 1983.

### N-CoR

- 5 N-CoR stellt ein Co-Repressorprotein für den Retinsäurerezeptor  $\beta$  dar, durch deren Assoziation eine Wechselwirkung mit responsiven Elementen von Genpromotorbereichen ausgelöst wird. Die Folge ist eine Repression der Transkription von Genen mit retinsäureresponsiven Elementen.

#### Literatur:

- 10 Soderstrom et al.: Differential effects of nuclear receptor corepressor (N-CoR) expression levels on retinoic acid receptor-mediated repression support the existence of dynamically regulated corepressor complexes; Mol. Endocrinol. 11: 682 (1997).

### Neurotensin (NTS)

- 15 Gene Map Locust: Chr. 12

Neurotensin ist ein kleines Neuropeptid mit 13 Aminosäuren. Es agiert vermutlich als Neurotransmitter im ZNS und ist in den catecholaminhaltigen Neuronen lokalisiert.

#### Literatur:

- 20 Bean, A.J. et al.: Cloning of human neurotensin/neuromedin N genomic sequences and expression in the ventral mesencephalon of schizophrenics and age/sex matched controls; Neuroscience 50: 259-268, 1992.

- 25 NF-1

Das Produkt des Neurofibromatose-1-Gens ist das Neurofibromin oder NF1-GAP. Die Neurofibromatose (Morbus von Recklinghausen) ist unter anderen durch Neurofibrome und Tumoren der Markscheiden gekennzeichnet. In 10 Familien mit NF-1-Mutation wurde gefunden, daß die Mutation schon über das Chromosom 17 vererbt worden war. Auf molekularem Level war an anderen Fällen auch eine homozygote Inaktivierung gezeigt worden, was den Hinweis erbrachte, daß es sich bei dem NF1-Gen um einen Tumorsuppressor handelt.

#### Literatur:

- Marchuk D.A., et al.: cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product; Genomics 11, 931-940, 1991.

- 35 NF-2

### Synonyme: merlin

- 40 Neurofibromatose Typ II ist eine erbliche maligne Erkrankung mit bilateralen Tumoren des 8. cranialen Nerven, Neurofibromen, Meningiomen, Gliomen oder Schwannomen. Das in dieser Krankheit defekte Gen ist das NF-2-Tumorsuppressor, das auf Chromosom 22q12.2 liegt. Es weist Homologien zu Proteinen auf, die das Cytoskelett mit Proteinen der Zell-Membran verbinden (Moosin, Ezrin, Radixin). Mutationen im NF-2-Gen wurden auch bei sporadischen Meningiomen, Schwannomen und darüber hinaus bei Melanomen und Mammakarzinomen gefunden.

#### Literatur:

- 45 Trofatter et al.: A novel moosin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor; Cell 72: 791-800, 1993.

- 50 nm23

Das nm23-H1-Gen stellt einen potentiellen Metastasensuppressor dar. Das Protein dieses Gens ist mit humaner Erythrozyten-Nukleosid-Diphosphatkinase identisch. Die Expression verhält sich negativ proportional zur Ausbildung von Lymphknotenmetastasen.

#### Literatur:

- 55 Royds J.A., et al.: Nm23 protein expression in ductal in situ and invasive human breast carcinoma; J. Natl. Cancer Inst. 85, 727-31, 1993.

### OR (Östrogen-Rezeptor)

- 60 Synonym: ER

Der Östrogen-Rezeptor gehört in die Gruppe der Steroid-Thyroid-Hormon-Rezeptoren, die sequenzspezifisch als Homodimere an DNA binden und die Transkription ihrer Zielgene modulieren. Diese Funktion kann erst dann aufgenommen werden, wenn der Rezeptor seinen Liganden (Östrogen) gebunden hat. Somit stellt diese Proteinfamilie ein Bindeglied zwischen Signalen, welche die Zelle von Außen erreichen, und der Transkription dar. Neben seiner Funktion als wichtiger Regulator von Wachstum und Differenzierung der Brustdrüse und des weiblichen Reproduktionstraktes spielt der Östrogen-Rezeptor in der Entwicklung Mammakarzinomen eine Rolle. Viele Brustkrebstumoren und -zellen sind im Wachstum von der Stimulation durch Östrogen und somit von einem funktionsfähigen Östrogen-Rezeptor abhängig.

## DE 197 36 691 A 1

Dieser Zusammenhang wird in der sehr wirksamen Antihormon-Therapie ausgenutzt, bei der die Östrogen-Rezeptorwirkung blockiert wird. Der Gehalt eines Tumors an Östrogen- und Progesteron-Rezeptor ist somit ein wichtiger prognostischer Marker für das Anschlagen der endokrinen Therapie.

Vom Östrogen-Rezeptor wurden verschiedene Splice-Varianten beschrieben, denen eine Funktion bei der Tumorentstehung bzw. Metastasierung zugeschrieben wird, da sie zu Proteinen führen, die eine veränderte Funktion aufweisen. So wurde unter anderem Brustkrebszelllinien und Tumoren eine Variante des Östrogen-Rezeptors gefunden, dem das Exon 5 und damit ein Teil der Hormon-Bindungsdomäne fehlt. Dieser Variante wird eine konstitutive, also hormonunabhängige transkriptionelle Aktivität zugeschrieben, die zu einem unkontrollierten Wachstum führen könnte.

Literatur:

Circene et al.: Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA; Science 231: 1150-1154, 1986.

### P-Glykoprotein (MDR1)

Synonyme: PGY-1; MDR1; GP170 Doxorubicin Resistance Gene; Multidrug Resistance Gene

Bei der Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika tritt oft eine "multi drug resistance" gegen viele, strukturell verschiedene Therapeutika simultan auf. Experimentell konnte in Zellkulturen, die unter dem Einfluß dieser Chemotherapeutika kultiviert wurden, eine Amplifikation des *mdr1*-Lokus, der auf Chromosom 7q21.1 liegt, beobachtet werden. In Übereinstimmung dazu fand sich in allen analysierten Zelllinien mit bestehender Chemoresistenz eine gesteigerte Expression dieses Gens. Das *mdr1*-Gen kodiert für eine in der apikalen Membran lokalisierte Efflux-Pumpe für Cytostatika. Dieses Gen wird physiologisch in sekretorischen Organen in hohem Maß exprimiert.

Literatur:

Gros et al.: Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins; Cell 47: 371-380, 1986.

### p16

Synonyme: p16(INK4) oder CDKN2; MTS1

Mit P16 wird der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor bezeichnet. Das Gen wurde ursprünglich als *mts1* (multiple tumor suppressor 1) symbolisiert. Charakteristisch für *mts1* sind Deletionen in einer Vielzahl von Tumoren. Das p16 Gen wurde auf Chromosom 9p21 kartiert. In Melanomen sind sowohl Deletionen als auch Mutationen dieses Gens entdeckt worden. Die Häufigkeit von Deletionen des CDKN2-Gens in Tumorzellen weist auf ein Suppressor-Gen hin.

Literatur:

Stone S., et al.: Complex structure and regulation of the p16 (MTS1) locus; Cancer Res. 55, 2988-2994, 1995.

### p21

Die Cyclin-abhängige Kinase CDK2 ist mit Cyclin A, D, und E assoziiert und an der Kontrolle der G1- und S-Phase des Zellzyklus beteiligt. Das P21 betrifft den humanen Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor. CDK-interagierende Proteine sind die CDKs. Es wurde gefunden, daß das CIP1 ein neuartiges 21-kd Protein kodiert. Literatur: Harper J.W., et al.: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases; Cell 75 (4), 805-16, 1993.

### p53

Das p53-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17. Es enthält 393 Kodons und kodiert für ein nukleäres Protein von 53 000 Dalton. Das P53 ist ein entscheidender Regulator des Zellzyklus und ein Transkriptionsfaktor. Bei Menschen gehören Mutationen im p53-Gen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in bösartigen Tumoren. In der Mehrzahl dieser Tumoren findet man den Verlust eines Allels des p53-Gens (Tumorsuppressor-Gen). Bei Mutationen des p53-Gens handelt es sich fast ausschließlich um Punktmutationen, die in einem weiten Bereich des Gens vorkommen. Dabei sind vor allem vier phylogenetisch konservierte Domänen des Genprodukts betroffen. Mutationen finden sich am häufigsten in den Exonen 4 bis 8 und bilden dort sogenannte hot spots. Eine Mutation führt meistens zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des Genprodukts, welches dann in erhöhter Konzentration im Tumor nachweisbar ist.

Literatur:

Levine A.J.: The p53 tumor suppressor gene; Nature 351, 453, 1991.

### PDGF (Platelet-derived growth factor)

Synonyme: PDGF; GDGF; GDGF-1; GDGF-2; GSM; MDT; MDGF; ODGF; T47D factor

PDGF besteht aus 2 verwandten Peptidketten. PDGF-A (Chromosom 7) und PDGF-B (Chromosom 22). Daraus können drei Isoformen resultieren, die PDGF mit unterschiedlichen Affinitäten binden können und ebenfalls in ihren biologischen Aktivitäten differieren. PDGF wird hauptsächlich von Megakaryozyten gebildet, aber auch eine Vielzahl anderer Zelltypen synthetisieren PDGF. PDGF ist ein lokaler, autokriner und parakriner, chemotaktisch wirkender Wachstumsfaktor, potenter Vasokonstriktor und Angiogenesefaktor.

Literatur:



## DE 197 36 691 A 1

Westermarck und Sorg: Biology of platelet-derived growth factor, Karger, Basel 1993.

### Peptid YY

Synonym: PYY

PYY wird endokrin von Zellen des Dünndarms, des Colons und des Pankreas synthetisiert. Zielort ist der Gastrointestinaltrakt, PYY die Magensäureproduktion, die Ausschüttung von Verdauungsenzymen des Pankreas und die Darmbewegung inhibiert. Das Gen beinhaltet 4 Exone über 1,2 kb DNA.

Literatur:

Forst, Y. et al.: Gene duplication of the human peptide YY gene (PYY) generated the pancreatic polypeptide gene (PPY) on chromosome 17q21.1; Genomics 26: 77-83, 1995.

### Perforin-1

Synonyme: Cytolysin; C9-related protein; pore-forming protein; PFP

Perforin-1 gehört zu einer Klasse von cytolytischen Proteinen, welche die Membranen von Zielzellen permeabilisieren, ähnlich wie das der C9-Komplementkomplex bewirkt. cytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen synthetisieren Perforin-1, welches durch IL 1 und IL2 induziert werden kann und auf Chromosom 10 lokalisiert ist.

Literatur:

Ojcius und Young: Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? TIBS 16: 225-229, 1991.

### PR (Progesteron-Rezeptor)

Synonym: PGR

Der Progesteron-Rezeptor gehört zur Gruppe der ligandenaktivierten Kern-Rezeptoren. Um seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben zu können, muß das korrespondierende Steroidhormon Progesteron in den Zellen vorhanden sein. Ein hoher Gehalt an Progesteron-Rezeptor in einem Mammarkarzinom ist ein prognostischer Marker für das Ansprechen einer endokrinen Therapie und längeres Überleben. In Übereinstimmung damit hat Progesteron eine schützende Wirkung gegenüber Brustkrebs. Da der Progesteron-Rezeptor Östrogen-Rezeptor-abhängig reguliert wird, spricht seine Anwesenheit innerhalb einer Zelle für die Existenz eines funktionsfähigen Östrogen-Rezeptors. Dieser Zusammenhang macht die Analyse des Progesteron Rezeptors in Mammarkarzinomen besonders interessant, da indirekt die Anwesenheit beider wichtigen Steroidhormonrezeptoren bestimmt werden kann.

Literatur:

Miscali et al.: Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cDNA; Biochem. Biophys. Res. Commun. 143: 740-748, 1987.

### PSM (Prostata-spezifisches Membranantigen)

PSM ist ein 100 kDa Protein; das PSM-Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert. Normale und neoplastische Prostatazellen exprimieren diesen Antigen.

Literatur:

Israeli et al.: Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen; Cancer Res. 53: 227-230, 1993.

### PSA (Prostate-spezifisches Antigen)

Synonym: APS

PSA ist eine in der Prostata synthetisierte, dem Kallikrein ähnliche Protease, deren Expression Androgen-abhängig reguliert wird. Die Level dieses Antigens werden in Radioimmunoassays zur Diagnose und Überwachung von Prostatakarzinomen untersucht.

Literatur:

Lundwall et al.: Molecular cloning of human prostate specific antigen cDNA; FEBS Lett. 214: 317-322, 1987.

### Ras

Die zellulären Gene der ras-Gen-Familie werden nach den entsprechenden retroviralen Onkogenen bezeichnet. Ihre Namen sind: c-Harvey-ras (c-H-ras), c-Kirsten-ras (c-K-ras) und N-ras (in Neuroblastomen entdeckt). K-Ras und N-Ras besitzen 4 Exone. K-ras weist zwei alternative vierte Exone auf (V1a und V1b), so daß zwei isomorphe Produkte von K-ras vorkommen.

Die RAS-Proteine nehmen eine zentrale Rolle als Signalüberträger in der Zelle ein. Sie gehören zur Gruppe der GTP-bindenden Proteine. Die Aktivierung von Genen der ras-Familie erfolgt durch Punktmutationen. Von diesen Mutationen sind ausschließlich die Kodons 12, 13 und 61 betroffen. Sie finden sich sowohl in soliden als auch hämatopoetische

## DE 197 36 691 A 1

Tumoren, RAS-Mutationen können häufig in Pankreas-, Schilddrüsen- und colorectalen Karzinomen nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Mutationen in colorectalen Tumoren sind G-A-Transitionen, was Rückschlüsse auf alkylierende Agenzien zuläßt.

Literatur:

Hos. J.L.; Ras oncogenes in human cancer: A review; Cancer Res., 49, 4682-9, 1989.

### RD (Retinoblastom)

Der Verlust oder die Inaktivierung des rb-Gens ist für die Entstehung von Retinoblastomen entscheidend. Retinoblastome treten bei Kindern auf und entstehen aus der embryonalen Retina. Der Locus für das Retinoblastom (rb-1) liegt auf Chromosom 13q14. Das Gen besteht aus 27 Exonen. Es bildet das Protein RB-105. Der Verlust der Funktion des Gens in beiden Allelen führt zur Tumorentstehung. Mikrosatelliten und RFLP können bei familiären Retinoblastom für DNA-Diagnostik verwendet werden.

Literatur:

Friend S.H., et al.: Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein; PNAS 84, (24) 9059-63, 1987.

### RFT

Das Gen kodiert eine Rezeptor-Tyrosinkinase. Es besteht aus 20 Exonen und ist auf Chromosom 10q11 lokalisiert. Das ret-Onkogen ist häufig in papillären Schilddrüsenkarzinomen reexprimiert und mit einem anderen Gen rekombiniert. In den Fusionsproteinen sind extrazelluläre und transmembrane Domänen von RFT deletiert. Bei Patienten mit multipler endokriner Neoplasie vom Typ MEN 2A als auch bei Patienten mit familiärem Schilddrüsenkarzinom (FMTC) wurden zu einem hohen Prozentsatz Keimbahnmutationen des ret-Onkogens nachgewiesen.

Literatur:

Viglietto G et al.: RFT/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis; Oncogene 1995 Sep 21, 11 (6): 1207-10.

### SCCA-1 (Squamous Cell Carcinoma Antigen-1)

SCCA-1 ist eine Mitglied der Ovalbumin-Familie von Serinproteinase-Inhibitoren. Das Protein wurde aus einem metastatischen Cervix-"Squamous-Cell"-Karzinom isoliert. Während das Protein in den oberflächlichen und intermediären Layern von Plattenepithelien vorkommt, wird die mRNA in subbasalen und basalen Schichten exprimiert. SCCA-1 wird als Marker für Plattenepithelkarzinome insbesondere der Cervix, des Halses und Nackens, der Lunge und des Ösophagus benutzt, wobei die Menge des Antigens im Blut mit dem Verlauf korreliert.

Literatur:

Schmeider et al.: A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 3147-3151, 1995.

### Selectine

#### P-Selectin

#### L-Selectin

#### E-Selectin

Selectine sind transmembrane Glykoproteine, die auf verschiedenen Zelltypen exprimiert werden, wie Plättchen (P-Selectin), Leukozyten (L-Selectin) und Endothelzellen (E- und P-Selectin). Die Selectine bewirken das sogenannte "Rolling" von Zellen an der Gefäßwand der Blutgefäßsysteme, der erste Schritt zur Extravasation von Zellen aus dem Blutgefäß heraus in das Gewebe. Glykoproteine und -lipide stellen die Liganden der Selectine dar. Das Expressionsmuster der Selectine und deren Liganden auf Zellen läßt Rückschlüsse auf das Rezirkulationsverhalten der entsprechenden Zelle zu.

Literatur:

Springer, T.A. et al.: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm; Cell 76: 301-314, 1994.

### SF (Scatter-Faktor)

#### Synonym: Hepatocyte growth factor (HGF)

SF wird hauptsächlich von mesenchymalen Zellen, Stroma und Fibroblasten exprimiert und ist ein parakriner Mediator von mitogenen, motogenen und morphogenen Antworten an Lipidzellen, die den Rezeptor von SF/HGF; c-met, tragen. SF ist ein potenter Angiogenese- und Motilitätsfaktor, der als autokriner Faktor von Tumorzellen ihre Invasivität und die Tumorentstehung vorantreiben kann.

Literatur:

Nakanura et al.: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor; Nature 342: 440-443, 1989;

## DE 197 36 691 A 1

Bellusci et al.: Creation of an hepatocyte-growth-factor/Scatter factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity; *Oncogene* 9: 1091-1099, 1994.

### SF-Rezeptor c-met

5

Synonyme: Proto-Onkogen met

Der Tyrosinkinase-Rezeptor für SF/IGF wird durch das Proto-Onkogen c-met kodiert und vermittelt beide Antworten des SF/IGF an die Epithelzellen: Wachstum und Mobilität. Ihm kommt damit eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung zu.

10 Literatur:

Park et al.: Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth factor receptors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6379-6383, 1987.

15

### STATS (Signal transduction and activator of transcription 5)

STAT's sind eine Familie von Proteinen, die sowohl Signaltransduktions-Funktion ausüben, als auch Transkriptionsaktivatoren sind. Ihre Funktion üben sie in Zellen aus, die durch Signalphosphopeptide stimuliert wurden. Es sind 6 verschiedene humane STAT-Proteine bekannt (7 wenn die duplizierten STAT5a und STAT5b als 2 verschiedene Gene gerechnet werden). Mehr als 30 verschiedene Polypeptide sind bekannt, die eine STAT-Aktivierung bewirken.

20 Literatur:

Darnell: Reflections on STAT3, STAT5 and STAT6 as for STATs; *PNAS* 93: 6221-6224, 1996.

25

### Surfactant-Proteine

Synonyme: Surfactant Protein (SP)-A, -B, -C, -D

Lungen-Surfactant, ein Lipoprotein-Komplex, ist für die normale Lungenfunktion essentiell. Surfactant-Protein A wird z. B. nur Alveolarepithelzellen Typ II und Clara-Zellen im Lungengewebe und SP-C exklusiv nur von Alveolarzellen Typ II exprimiert. Es existieren mehrere Surfactant-Proteine (A1 und A, B, C und D), deren Expression (z. B. mRNA) in metastatischen, mikrometastatischen, pulmonären und extrapulmonären Adenokarzinomen, nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und Mammakarzinomen beschrieben wurde.

30 Literatur:

Betz et al.: Surfactant protein gene expression in metastatic and micrometastatic pulmonary adenocarcinomas and other non-small cell lung carcinomas: detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction; *Cancer Res.* 55: 4283-4286, 1995.

35

### Telomerase

40 Telomerasen definieren die Enden von Chromosomen. Diese Enden bestehen aus einer Reihe von kurzen tandem repeats der DNA. Humane Telomere bestehen aus mehreren Kilobasen von (TTAGGG)<sub>n</sub>-Wiederholungen.

Literatur:

Morin G.B., et al.: Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassemia by human telomerase; *Nature* 353: 454-456, 1991.

45 Blackburn E.H.: Structure and function of telomeres; *Nature* 350: 569-573, 1991.

### TGF-alpha (Transforming growth factor alpha)

Synonyme: MDGF-2 (milk-derived growth factor 2); TGF-1; TCGF (transformed cell growth factor)

50

TGF-alpha wird von einer großen Anzahl von Karzinomen und (durch virale oder zelluläre Onkogene) transformierten Zelllinien exprimiert. Weitere Produzenten von TGF-alpha sind Keratinozyten, Makrophagen, Hepatozyten und Thrombozyten. Seine Synthese wird bei Virusinfektionen und im Brustgewebe durch Östrogene induziert. TGF-alpha besitzt ähnliche Funktionen wie TGF und bindet auch an dessen Rezeptor. Es kann als autokriner Wachstumsfaktor bei Ovarkarzinomen oder als hämatopoetischer Wachstumsfaktor wirken. Das TGF-alpha-Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert und scheint in-vitro ein stärkerer Angiogenesefaktor zu sein als EGF. Durch die Produktion seitens der Tumorzellen und Makrophagen im Gewebe scheint es bei der Vaskularisation von Tumorgewebe eine Rolle zu spielen.

55 Literatur:

Derynck: The physiology of transforming growth factor- $\alpha$ ; *Advances in Cancer Research* 58: 27-52, 1992.

60

### TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases)

Die TIMP's gehören zu einer Familie von Inhibitoren, welche die Aktivität von Metalloproteinasen hemmen, damit der Gewebeauflösung entgegenwirken und auch die Invasion und Metastase von Karzinomzellen in das Gewebe mitbestimmen.

65 Literatur:

Apte et al.: Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22; *Genomics* 19: 86-90, 1994.

## DE 197 36 691 A 1

### TNF-alpha (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha)

Synonyme: Cachectin; Monocyte/Macrophage-derived TNF; cytotoxin (CTX); endogenous pyrogen; TNF-a

TNF-alpha wird von aktivierten Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen und Mastzellen produziert. Fast alle Zielzellen tragen TNF-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. TNF-alpha ist als Dimer oder Trimer funktionell auf Chromosom 6 lokalisiert, ganz in der Nähe von HLA-DR oder HLA-A. TNF-alpha übt einen direkten cytotoxischen und apoptotischen Effekt auf Tumorzellen aus, ist außerdem direkt in die Entwicklung einer entzündlichen Reaktion involviert, und zwar durch die Induktion von Interleukinen, Wachstumsfaktoren und entzündlichen Faktoren, die zur Gewebszerstörung führen können. TNF-alpha ist ebenfalls stark durch Lndotoxin induzierbar und unmittelbar am septischen Schock beteiligt.

Literatur:

Wang et al.: Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor; Science 228: 149-154, 1985.

### TNF-R1 p55

Synonyme: CD120a; cytotoxischer TNF-R

TNF-R1 steht für den humanen Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1. Der TNF-alpha gehört zu den Cytokinen. Seine Wirkung wird durch die Bindung an einen Zelloberflächen-Rezeptor erreicht. Das TNF-R1 Gen ist auf Chromosom 12p13 lokalisiert. TNF-R1 vermittelt hauptsächlich die Cytotoxizität und Apoptose.

Literatur:

Loetscher H., et al.: Molecular cloning and expression of the human 55kd tumor necrosis factor receptor; Cell 61, 351-359, 1990.

### TNF-R2 p75

Synonym: CD120b; TNFBR

TNF-R2 ist der größere der beiden TNF-Rezeptoren (TNF-R75). Der Faktor wird in vielen Zellen mäßig, in stimulierten T- und B-Lymphozyten allerdings stark exprimiert.

Das TNF-R2-Gen besteht aus 10 Exonen und überspannt einen Bereich von 26kd des Genoms. Die meisten der funktionellen Domänen stellen separate Exone dar. Die Struktur ähnelt der von TNF-R1. TNF-R2 liegt auf Chromosom 1p36 und vermittelt hauptsächlich die T-Zellaktivierung.

Literatur:

Beltinger C.P.: Physical mapping and genomic structure of the human TNF-R2 gene; Genomics 35, 94-100, 1996.

### Topoisomerase II

Synonyme: TOPO; TOP2A; Topoisomerase Alpha

DNA-Topoisomerasen sind ATP-abhängige Enzyme, die den topologischen Status der DNA kontrollieren. Topoisomerase II katalysiert die Relaxation von supercoiled DNA-Molekülen. In die DNA interkalierende Chemotherapie inhibieren die Funktion dieses Enzyms und bewirken Doppelstrangbrüche der DNA. Das Auftreten dieser Doppelstrangbrüche ist eine Funktion der Aktivität der Topoisomerase und der Wirksamkeit des Medikaments. Eine Chemoresistenz kann in solchen Tumoren gefunden werden, in denen die Aktivität der Topoisomerase herabgesetzt ist, wie beispielsweise durch eine reduzierte Expression. Weiterhin wurde eine Mutation des Topoisomerase-Gens aus chemoresistenten Zelllinien isoliert, die bewirkt, daß das Enzym nicht mehr durch das Chemotherapeutikum inhibiert wird.

Literatur:

Hinds et al.: Identification of a point mutation in the topoisomerase II gene from a human leukemia cell line containing an Amrascrine-resistant form of topoisomerase II; Cancer Research 51: 4729-4731, 1991.

### Translokationen und Rearrangements

#### B- und T-Zellrezeptor-Rearrangements

Im Verlauf der Differenzierung von B-Zellen werden die Immunglobulin(Ig)-Gene rearrangiert, wobei auf Chromosom 14 die Ig-schwere-Kette-Gene und auf den Chromosom 2 (kappa) bzw. Chromosom 22 (lambda) die leichte-Kette-Gene liegen. Während der Reifung von T-Zellen wird der T-Zell-Rezeptor (TCR) rearrangiert. Auf Chromosom 14 sind die TCR-alpha- und TCR-delta-Gene betroffen sowie auf Chromosom 7 der TCR-beta-Locus. Dabei entsteht eine für jede T-Zelle und ihre Nachkommen spezifische Sequenz durch die unpräzise Verknüpfung der variablen (V) und diversity (D)-Regionen und zufällige Inkorporation von zusätzlichen Nukleotiden. Findet sich im Blut eines Patienten eine Vermehrung eines T-Zell-Klones, läßt sich hinter dem polyklonalen Hintergrund aller restlichen T-Lymphozyten diese identifizieren.

Literatur:

Trainor et al.: Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction; Blood, 78, 192-196, 1991.

Lehman et al.: Comparison of PCR with southern hybridization for the routine detection of immunoglobulin heavy chain

## DE 197 36 691 A 1

gene rearrangements; Hematopathology, 103, 171-176, 1995.

### Translokation (14; 18)

- 5 Diese Translokation ist die häufigste in humanen Lymphomen. Sie findet sich in mehr als 80% der folliculären Lymphome, in ca. 20% der diffusen großzelligen Lymphome und in ca. 50% der akuten undifferenzierten Lymphome. Durch diese Translokation wird die Immunglobulin-schwere-Kette auf Chromosom 14 mit dem *bcl-2*-Gen auf Chromosom 18 verbunden. Als Folge der Translokation wird das *bcl-2*-Gen unter die Kontrolle des Immunglobulin-schwere-Kette-Promotors gestellt und transkriptionell aktiviert, was zu einer malignen Entartung der Zellen führt.

#### 10 Literatur:

Barker et al.: Cytometric detection of DNA amplified with fluorescent primers: applications to analysis of clonal *bcl-2* and *IgH* gene rearrangements in malignant lymphomas; *Blood*, 83, 1079-1085, 1994.

### Translokation (9; 22)

15

Synonyme: Philadelphia-Chromosom, BCR/ABL.

- Das Philadelphia-Chromosom kommt durch eine reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 zustande, die bei ca. 90% der Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) in den Tumorzellen zu beobachten ist. In geringerer Inzidenz findet sich dieses Rearrangement auch bei akuten lymphatischen Leukämien. Bei der Translokation wird das ABL-Proto-Onkogen von Chromosom 9 auf Chromosom 22 übertragen, wobei der Bruchpunkt hier innerhalb des BCR-Gens liegt (bei akuten lymphatischen Leukämien im ersten Intron, bei CML im Bereich der Exone 10 bis 13). Obwohl die Bruchpunkte auf der DNA-Ebene variabel sind, resultieren nur 3 verschiedene mögliche Fusions-transkripte, die zum Nachweis einer CML bzw. "minimal residual disease" genutzt werden können.

#### 25 Literatur:

Maurer et al.: Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction; *The Lancet*, 337, 1055-1058, 1991.

### Translokationen (2; 13) und (1; 13)

30

- In 68% der alveolären Rhabdomyosarkome findet sich als eine spezifische cytogenetische Anomalie die Translokation (2; 13), welche die Gene der Transkriptionsfaktoren PAX3 (Chromosom 2) und P13R (Chromosom 13) involviert sind. Durch die Translokation entsteht ein Fusionsprotein aus der N-terminalen Region des PAX3 und der C-terminalen Region des P13R-Proteins. Dieses hat die Eigenschaften eines Transkriptionsfaktors, welcher in die physiologische Transkriptionsregulation eingreift und an der Onkogenese beteiligt ist.

35

14% der alveolären Rhabdomyosarkome weisen die Translokation (1; 13) auf, wobei statt des PAX3-Gens auf Chromosom 2 das PAX7-Gen auf Chromosom 1 involviert ist.

#### Literatur:

Sreekantiah et al.: Chromosomal aberrations in soft tissue sarcomas; *American J. Pathol.*, 144: 1121-1134, 1994.

40

### Translokation (x; 18)

- Diese Translokation findet sich in 91% aller Synovialsarkome. Beteiligt sind das SSX-Gen von Chromosom X und das SYT-Gen von Chromosom 18, was zu einem Fusionstranskript führt. Die Funktion beider Gene ist bislang unbekannt. Da allerdings ein Teil der Synovialsarkome diese Translokation als einzige cytogenetische Anomalie aufweisen, liegt der Schluß nahe, daß das Fusionsprotein eine Schlüsselposition bei der Tumorentwicklung einnimmt.

45

#### Literatur:

Clark et al.: Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the (X; 18)(p11.2; q11.2) translocation found in human synovial sarcoma; *Nature Genetics*, 7, 502-508, 1994.

50

### Translokation (12; 16)

- In diese Translokation, die in 77% aller myxoiden Liposarkome vorkommt, sind die Gene des Transkriptionsfaktors CHOP (Chromosom 12) und das FUS-Gen (Chromosom 16), dessen Funktion bislang unbekannt ist, involviert. Durch die Translokation entsteht ein Fusionstranskript, dessen Protein den N-terminus des FUS-Proteins und den C-terminus des CHOP-Proteins enthält.

55

#### Literatur:

Rabbits et al.: Fusion of the dominant negative transcription factor CHOP with a novel gene FUS by translocation (12; 16) in malignant liposarcoma; *Nature Genetics*, 4, 175-180, 1993.

60

### Translokation (11; 22)

- Diese Translokation findet sich in 86% aller Ewing's Sarkome und hat die Bildung eines Fusionstranskriptes zur Folge, das aus dem EWS-Gen (Chromosom 22), dessen Funktion noch unbekannt ist, und dem FLI-Gen (Chromosom 11), welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert, besteht.

65

#### Literatur:

West et al.: Detection of circulating tumor cells in patients with Ewing's Sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor; *J. Clin. Oncol.*, 15, 583-588, 1997.

# DE 197 36 691 A 1

## $\alpha$ - und $\beta$ -Tubulin

Tubuline stellen die Monomerbestandteile der Mikrotubuli des Cytoskeletts dar. Es handelt sich um GTP/GDP-bindende Proteine, die durch Hydrolyse des GTP zu intrazellulären Fasern polymerisieren. Mikrotubuli sind Voraussetzung für die Ausbildung des mitotischen Spindelapparates, der Navigation von Organellen und der Kommunikation von extrazellulärem Raum mit dem Zellkern und damit der Genexpression.

### Literatur:

Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol®); J. Biol. Chem. 272: 2534 (1997).

## Tyrosinase

Die Tyrosinase ist ein Schlüsselenzym der Melanin-Synthese, das bei Mutation zu Albinismus führt und ausschließlich in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert wird. Der Nachweis Tyrosinase-exprimierender Zellen im Blut weist daher auf das Vorhandensein zirkulierender Melanomzellen im Blut hin.

### Literatur:

Giebel et al.: Organization and nucleotide sequence of the human tyrosinase gene and a truncated tyrosinase-related segment; Genomics 9: 435-445, 1991.

## UPA (Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator) und PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor-1)

UPA ist ein proteolytisches Enzym, von dem angenommen wird, daß es an der Tumorzell-Invasion in umgebendes Gewebe beteiligt ist. Seine Expression korreliert mit einer gesteigerten Invasivität, tumor-assoziiierter Angiogenese und Metastasierung. Seine Aktivität wird durch einen Inhibitor (PAI-1) reguliert. Untersuchungen unter anderem am primären Mammakarzinom und Magenkarzinom haben gezeigt, daß hohe Level an UPA mit einer schlechten Prognose einhergehen. In Übereinstimmung damit findet sich in aggressiven Tumorzellen keine Expression von PAI-1. Im Tiermodell konnte weiterhin gezeigt werden, daß PAI-1-positive Zellen kleinere Tumore bildeten als PAI-1-negative Kontrollzellen. Zusätzlich war in PAI-1-positiven induzierten Tumoren die Dichte der Mikrovaskulatur um 20 bis 40% reduziert. Das Gleichgewicht von UPA und PAI-1 bildet also einen prognostischen Parameter für die Metastasierungs- und Angiogenesefähigkeit eines Tumors.

### Literatur:

Ito et al.: Prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitors PAI-1 and PAI-2 in gastric cancer; Virchows Arch. 427: 487-497, 1996.

## VEGF (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor)

Synonyme: VPF; vascular permeability factor; vasculotropin; CX(glioma-derived)-VEGF

VEGF ist ein Homodimer mit 24 kDa Untereinheiten; der humane VEGF kann in vier Formen auftreten, welche die Folge alternativen Spleißens der mRNA sind, wobei VEGF121 und VEGF165 lösliche Formen sind, während VEGF189 und 206 meistens an Heparin-Proteoglykane oder an Basalmembranen gebunden sind. VEGF wird u. a. von kultivierten, vaskulären weichen Muskelzellen, aber auch von Makrophagen produziert und wirkt vornehmlich auf vaskuläre Endothelzellen mitogen. VEGF scheint eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Blutgefäßformation und -permeabilität zu spielen und darüber hinaus ein Hauptregulator der Tumorangio-genese zu sein. VEGF vermittelt seine Funktionen über zwei hochaffine Rezeptoren. Die Lokalisation des VEGF-Gens wurde auf Chromosom 6 beschrieben.

### Literatur:

Leung et al.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen; Science 246: 1306-1309, 1989.  
Tischer et al.: The human gene for vascular endothelial growth factor: multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing; J. Biol. Chem. 266: 11947-11954, 1991.

## VEGF-R1 (VEGF-Rezeptor 1)

Synonyme: FMS-like Tyrosine kinase-1; flt1 vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor; oncogene flt

Der für VEGF hochaffine Glykoprotein-Rezeptor VEGF-R1 wird hauptsächlich von vaskulären Endothelzellen exprimiert und ist auf dem Chromosom 13 lokalisiert. Oftmals wird eine erhöhte Expression von VEGF-R1 in Karzinomen beschrieben.

### Literatur:

Shibuya et al.: Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family; Oncogene 5: 519-524, 1990.

## VEGF-R2 (VEGF-Rezeptor-2)

Synonyme: KDR; Tyrosine kinase growth factor receptor; FLK-1 receptor for vascular endothelial growth factor; FLK1; kinase insert domain receptor

Das Gen für VEGF-R2 ist auf Chromosom 4 lokalisiert. FLK-1 ist das Maus-Homolog für humanes KDR, welches

VEGF mit hoher Affinität bindet. VEGF-R2 wird hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert und ist für die Entwicklung von Blut und Blutgefäßen wichtig. Die Hochregulation von VEGF-mRNA in Tumorzellen und der mRNA seiner Rezeptoren in der Tumervaskulatur korreliert mit einer erhöhten Aggressivität des Tumors. VEGF-R2 wird außerdem in Melanom- und Ovarialtumorzellen transkribiert.

5 Literatur:

Terman et al.: Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase; *Oncogene* 6: 1677-1683, 1991;

Boockock et al.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma; *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 506-516, 1995.

10

#### VIII. (Von Hippel-Lindau Syndrom)

Das VHL-Genprodukt ist ein Tumorsuppressor-Protein, das bei erblichen Mutationen zu Nierenkarzinomen, Hämangiomen von Kleinhirn und Retina, Phäochromocytomen und Lipendymomen führt. Eine Beteiligung an der Entstehung spontaner Tumoren konnte ebenfalls gezeigt werden. Das VHL-Genprodukt zeigt keinerlei Verwandtschaft zu anderen bekannten Proteinen. Es ist in der Lage, an die Transkriptions-Elongations-Faktoren Elongin B und C zu binden und so die Transkription zu inhibieren. Da die Proteindomäne des VHL-Gens, die für diese Interaktion verantwortlich ist, häufig in Tumoren mutiert ist, scheint es sich hierbei um die tumorsuppressorische Funktion des Gens zu handeln. Eine interessante weitere Funktion des Proteins ist, daß es in Abhängigkeit von der Zelldichte in den Kern transloziert. Die Transkriptionsinhibition wird also in Abhängigkeit von der Zelldichte ausgeübt.

20 Literatur:

Latif et al.: Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene; *Science* 260: 1317-1320, 1993.

#### Virale Onkogene

25

Es gibt genügend Hinweise dafür, daß Viren ursächliche Faktoren bei der Genese bestimmter Krebsformen sind. Die Onkogenese kann dabei auf eine erhöhte Virusaktivität des infizierten Wirtes zurückgeführt werden. Anhand epidemiologischer Daten kann aber auch nachgewiesen werden, daß die virale Onkogenese ein multifaktorieller Prozeß ist, für den neben den viralen Agenzien auch wirtsspezifische Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Immunkompetenz und andere exogene Faktoren von Bedeutung sein können.

30

Von besonderer Bedeutung für die virale Onkogenese sind Hepatitis-B- und -C-Viren in Bezug auf Leberzellkarzinome, das HTLV-1-Virus im Zusammenhang mit T-Zell-Lymphomen, das Epstein Barr Virus (EBV) im Zusammenhang mit Burkitt Lymphomen, Nasopharyngeal Karzinomen und der Hodgkin-Erkrankung und humane Papillomaviren der Typen 16 und 18 im Zusammenhang mit Karzinomen im Urethro-Genital Bereich, insbesondere der Cervix. Weiterhin werden Herpesviren der Typen 4 und 6 und das HHV-8-Virus im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren diskutiert.

35

Literatur:

Mueller M.: Overview: viral agents and cancer; *Environ. Health Perspect.* 103 (1995) Suppl. 8, 259-261.

#### Leberzellkarzinome

40

Das Hepatitis-C-Virus (HCV) wird als hauptsächlicher Faktor von klonalen B-Zell-Expansionen in Typ II Cryoglobulinämien angesehen. Auch bei der Genese von Cryoglobulinämien-assoziierten B-Zell-Malignomen wird ein Zusammenhang mit HCV diskutiert. In einem Non-Hodgkin's Lymphom konnte HCV nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht bekannt, welches Virusprotein an der Karzinogenese ursächlich beteiligt ist. Diskutiert wird hier eine Beteiligung des C22-Proteins.

45

Literatur:

De-Vita S. et al.: Hepatitis C virus within malignant lymphoma lesion in the course of type II mixed cryoglobulinemia; *Blood* 86 (1995) 1887-1892.

Bei der Genese von Leberzellkarzinomen ist als virales Agens auch das Hepatitis B-Virus (HBV) von Bedeutung. Als virales Onkogen wird hier vor allem das HBx-Gen diskutiert. Es konnten in Leberkarzinom-Zellen integrierte Sequenzen des X-Gens nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wird auch eine Blockierung der p53-induzierten Apoptose durch das HBx-Gen diskutiert. Neben dem X-Gen wird auch eine Beteiligung des Pre-Core-Gens an der viralen Onkogenese angenommen.

50

Literatur:

55

Koike K.: Hepatitis B virus Hbx gene and hepatocarcinogenesis; *Intervirology* 38 (1995) 134-142.

Im Zusammenhang mit Leberzellkarzinomen werden auch Onkogene des SV40 diskutiert, insbesondere das T-Antigen dieses Virus. Dabei könnte es zu einem virusinduzierten Verlust der Heterozygotie von Bereichen des Chromosoms 7 kommen. Auch die Inaktivierung der Tumorsuppressor-Proteine p53 und pRb durch virale Onkogene wird in diesem Zusammenhang diskutiert.

60

Literatur:

Casola S. et al.: Preferential loss of heterozygosity of chromosome 7 loci in simian virus 40 (T) antigen-induced mouse hepatocellular carcinomas does not involve H-ras mutations; *Acta Genet. Med. Gemellol Roma* 45 (1996) 221-225.

E Hara et al.: The helix-loop-helix protein Id-1 and a retinoblastoma protein binding mutant of SV40 T-antigen synergize to reactivate DNA synthesis in senescent human fibroblasts; *Dev. Genet.* 18 (1996) 161-172.

65

## DE 197 36 691 A 1

Urethro-Genital-Karzinome (Cervixkarzinome, Zervixkarzinome, Vulvakarzinome, Prostatakrebs, Analkrebs, Blasenkrebs)

Es bestehen ursächliche Zusammenhänge zwischen der Krebsentstehung und den Onkogenen E6 und E7 der humanen Papillomaviren der Typen 16 und 18. Diese viralen Onkogene werden im Zusammenhang mit der Blockierung der p53- und p16 gesteuerten Apoptose diskutiert.

Literatur:

Beysr-Finkler E. et al.: Human Papillomavirus DNA in genital cancers, metastases and lymph nodes; Intervirology 38 (1995) 173-180.

Moyet-Lalle C. et al.: ras, p53 and HPV in benign and malignant prostate tumors; Int. J. Cancer 64 (1995) 124-129.

Lymphome (Non Hodgkin-Lymphome, Burkitt-Lymphome, T-Zell-Lymphome, B-Zell-Lymphome)

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) wird im Zusammenhang mit einer Anzahl humaner Karzinome diskutiert. Eine besondere Rolle spielt dieses Virus bei der Genese von Burkitt-Lymphomen, nasopharyngealen Lymphomen und B-Zell-Lymphomen. Auch hier kann die Expression des p53 durch virale Onkogene verändert werden.

Literatur:

Lee J.H. et al.: Altered p53 expression in Epstein Barr virus positive T cell lymphomas; J. Korean Med. Sci. 10 (1995) 399-405;

Tomita Y. et al.: Sporadic activation of Epstein Barr virus in thyroid lymphoma; Leuk. Lymphoma 19 (1995) 129-134.

Für die Genese von Lymphomen sind auch Retroviren, wie HTLV-I und HIV von Bedeutung. Das HIV-1 Virus wird vor allem im Zusammenhang mit der Genese von Non-Hodgkin-Lymphomen diskutiert.

Literatur:

Wang C.Y. et al.: Lymphoma associated with human immunodeficiency virus infection; Mayo Clin. Proc. 70 (1995) 665-672;

Maroushek S.R. et al.: Sequence analysis of human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I env genes amplified from central nervous system tissues of patients with HTLV-I-associated myelopathy or leukemia; Microb. Pathog. 19 (1995) 317-333.

Lungenkarzinome

Im Zusammenhang mit der Genese von Lungenkrebs durch virale Onkogene sind vor allem Adenoviren von Bedeutung, insbesondere das virale Onkogen E1a. Eine Rolle spielen in diesem Zusammenhang aber auch Epstein-Barr-Viren.

Literatur:

Hogg J.C., Hegele R.G.: Adenovirus and Epstein Barr virus in lung disease; Semin Resp. Infect. 10 (1995) 244-253.

WT1

Bei den Wilms Tumoren handelt es sich um Nierentumore des Kindes. Etwa 1% der Tumoren sind hereditär und der Erbgang ist autosomal-dominant. Die chromosomale Lokalisation des WT1-Gens ist 11p13. Bei etwa 15% der Patienten mit sporadischen Wilms-Tumoren ist dieser Chromosomenbereich deletiert oder mutiert. Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Tumorsuppressor-Gen. WT1 spielt bei der Nephrogenese eine Rolle.

Literatur:

Bonetta L. et al.: Characterization of a homozygous deletion: mapping to the Wilms tumor region on 11p13; Cytogenet. Cell Genet. 51, 1989.

Gessler M. et al.: The genomic organization and expression of the WT1 gene; Genomics 12, 807-813, 1992.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Charakterisierung und Identifizierung disseminierter und metastasierter Krebszellen mit Hilfe von RNA und DNA, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Körperflüssigkeit auf

a) wenigstens ein krebspezifisches Gen und

b) wenigstens ein krebsassoziiertes Gen untersucht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den krebspezifischen Genen um Onkogene, mutierte Tumorsuppressor-Gene und/oder Gene handelt, die bei Nicht-Krebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit im wesentlichen nicht exprimiert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zur Charakterisierung der Onkogene und/oder mutierten Tumorsuppressor-Gene Mutationsanalysen des genetischen Materials dieser Gene durchgeführt werden.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß zur Charakterisierung der Gene, die bei Nicht-Krebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit im wesentlichen nicht exprimiert werden, Expressionsanalysen dieser Gene durchgeführt werden.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den krebsassoziierten Genen um gewebspezifische Gene, metastasierungsassoziierte Gene, Steroidhormonrezeptor-Gene, Chemoresistenz-Gene, und/oder Gene, die mit der Immunmodulation, Zellproliferation und/oder Apoptose korrelieren, handelt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die metastasierungsassoziierten Gene für Angiogenesefaktoren, Motilitätsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Matrixdegradationsfaktoren, wie Proteinase und deren Hemmstoffe, und/oder Adhäsionsfaktoren, wie Adhærin, kodieren.



## DE 197 36 691 A 1

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Charakterisierung der krebsassoziierten Gene Expressionsanalysen dieser Gene durchgeführt werden.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Körperflüssigkeit wenigstens auf die für CEA, CK20 und gegebenenfalls MUC1 kodierenden Gene untersucht.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Körperflüssigkeit wenigstens auf die für MAGF3, Tyrosinase und gegebenenfalls Muc18 kodierenden Gene untersucht.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Körperflüssigkeit auch auf die für PSM kodierenden Gene untersucht.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Körperflüssigkeit wenigstens auf die Gene p53 und erb-B2 untersucht.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Körperflüssigkeit auch auf c-myc und/oder K-ras untersucht.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Körperflüssigkeit wenigstens auf die für b1-G1, b1-G1-R, V1-G1, V1-G1-R1 und V1-G1-R2 kodierenden Gene untersucht.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit auch auf die für MMP's und TIMP's kodierenden Gene untersucht.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die zirkulierenden Krebszellen zunächst in an sich bekannter Weise aus der Körperflüssigkeit isoliert und charakterisiert oder nach der Isolierung kultiviert und dann charakterisiert.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mutationsanalysen auf DNA-Ebene und die Expressionsanalysen auf RNA-Ebene durchführt.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Körperflüssigkeit auch auf Proteine untersucht, die von den krebspezifischen und/oder krebsassoziierten Genen exprimiert werden.
18. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
19. Mittel nach Anspruch 18 in Form eines Test- und/oder Diagnosekits.